MEMBRANEIGENSCHAFTEN VON HOPANOIDEN UND LIPIDEN, DIE FETTSÄUREN MIT ENDSTÄNDIGEN VERZWEIGUNGEN UND ω - CYCLOHEXANRINGEN ENTHALTEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON
ELMAR KANNENBERG
AUS FULDA

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0013

MEMBRANEIGENSCHAFTEN VON HOPANOIDEN UND LIPIDEN, DIE FETTSÄUREN MIT ENDSTÄNDIGEN VERZWEIGUNGEN UND ω - CYCLOHEXANRINGEN ENTHALTEN

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS
DER NATURWISSENSCHAFTEN

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

VORGELEGT VON
ELMAR KANNENBERG
AUS FULDA

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.1983

Dekan : Prof. Dr. E. Kulzer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Poralla

2. Berichterstatter: Prof. Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1980 bis Januar 1983 am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I (Prof. Dr. H. Zähner), der Universität Tübingen, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. Poralla möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit danken und für seine stetige Bereitschaft, mir mit Rat beizustehen und bei anfallenden Problemen zu helfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. A. Blume (Institut für physikalische Chemie II der Universität Freiburg) für sein reges Interesse und die vielen Anregungen zu dieser Arbeit bedanken. Mein Dank gilt auch seiner Einführung in die Kalorimeter- und Monolayer-Technik und der tatkräftigen Unterstützungen bei meinen Messungen.

Herrn Prof. Dr. Th. Ackermann danke ich als Leiter des Instituts für physikalische Chemie II für die überaus freundliche Aufnahme an seinem Institut.

Allen Mitarbeitern dieses Instituts gilt mein Dank für die hilfreichen Unterstützungen meiner Arbeit.

Herrn Dr. R. McElhaney, Department of Biochemistry, University Alberta, Canada, gilt mein Dank für die Überlassung der PCs mit verzweigten Fettsäuren und seine Kooperation in diesem Teilkomplex der Arbeit.

Herrn Dr. H. Eibl, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, danke ich für die Synthese von ω-Cyclohexan-PC.

Herrn Dr. M. Rohmer, Ecole National Supérieure de Chimie, Mulhous/France, verdanke ich eine Vielzahl von Informationen über Hopanoide und die freundliche Überlassung von Diplopterol.

Herrn T. Härtner gilt mein Dank für seine ständige Hilfsbereitschaft und seine für mich ausgeführten Messungen.

Herrn G. Schneck danke ich für die Herstellung des Photometerzubehörs zur Streulichtmessung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biologie I der Universität Tübingen gilt mein Dank für die vielen Hilfen bei den so oft fehlenden Kleinigkeiten.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 9

2.1. Chemikalien 9
2.2. Organismen 11
2.3. Nährmedien 11
2.4. Tetrahydroxybacteriohopan- und Hopanglycolipidisolierung aus Bacillus acidocaldarius-Kulturen und deren Charakterisierung 13

2.4.1. Anzucht der Zellen 13
2.4.2. Aufarbeitung der Zellsuspension 14
2.4.3. Dünnschichtchromatographische Charakterisierung.... 18
2.4.4. Physikalische Charakterisierung und Reinheitsprüfung 18

2.5. Diplopterol-Isolierung aus Methylobacterium organophilum 19

2.5.1. Kultivierung von Methylobacterium organophilum 19
2.5.2. Isolierung von Diplopterol 20
2.5.3. Charakterisierung mittels DC-Platten 21

2.6. Versuche mit Mycoplasma mycoides 22

2.6.1. Anzuchtbedingungen 22
2.6.2. Versuche zur Adaptierung an HGL und Diplopterol.... 24

2.7. Die "Differential Scanning Calorimetry" (DSC)..... 25

2.7.1. Meßprinzip 26
2.7.2. Aufbau eines adiabatischen Differentialkalorimeters (DSC) 27
2.7.3. Herstellen der Lipiddispersion zur Messung im Differentialkalorimeter 29
2.7.4. Kalorimetrische Messungen im Privalov-Kalorimeter 30
2.7.5. Auswertung der Kalorigramme 30
2.7.6. Berechnung der Übergangsentropie ΔS und der $\Delta H_{van't\ Hoff}$-Reaktionsenthalpie 31
2.7.7. Phosphatanalyse 34

2.8. Monolayer-Methode 35

2.8.1. Das Meßprinzip 35
2.8.2. Die Monolayerfilmwaage 36
2.8.3. Die Meßbedingungen an der Filmwaage 38
2.8.4. Herstellen der Lipidfilme 38

2.9. Methode zur Messung relativer Permeabilitäten 39

2.9.1. Meßprinzip 40
2.9.2. Apparatur zur Messung schneller Änderungen der Lichtstreuung 42

UNIV. LEIDEN BIBL.

Seite

2.9.3. Liposomenpräparation 49
2.9.4. Präparation von PA aus PC 51

3. ERGEBNISSE 52

3.1. Charakterisierung der verwendeten Lipide 52

3.1.1. Phospholipide 52
3.1.2. Hopanoide 54

3.2. Kalorimetrische Messungen 59

3.2.1. Kalorimeterkurven reiner Lipide 59
3.2.2. Vergleich der untersuchten Lipide 63
3.2.3. Lipidmischungen mit THBH 65
3.2.4. Diskussion der kalorimetrischen Daten 68

3.3. Monolayeruntersuchungen 76

3.3.1. Cholesterin und Hopanoide 76
3.3.2. Phosphatidylcholine 80
3.3.3. Phosphatidylcholin/Triterpenoid-Mischungen 84
3.3.4. Vergleich der PC/Triterpenoid-Mischsysteme 92
3.3.5. Diskussion der Monolayerergebnisse 99

3.4. Permeabilitätsversuche 116

3.4.1. Ei- PC/Triterpenoid-Permeabilitäten 116
3.4.2. DCDPC/Triterpenoid 120
3.4.3. Diskussion der Permeabilitätsergebnisse 125

3.5. Versuche mit Mycoplasma 134

3.5.1. Hopanglycolipid-Versuche 135
3.5.2. Diplopterol-Versuche 136
3.5.3. Komplexierungsversuch mit Herbicolin 138
3.5.4. Diskussion der Versuche mit Mycoplasma 138

4. ABSCHLUSSDISKUSSION 144

4.1. PCs mit iso- und anteiso-Verzweigung 145

4.2. $C_{18:0}$-PC mit endständigen Cyclohexanringen 146

4.3. Hopanoide 150

4.4. Wachstumsexperimente mit Bacillus acidocaldarius 153

4.5. Ausblick 156

5. ZUSAMMENFASSUNG 157

6. LITERATURVERZEICHNIS 161

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

h	Stunden
min	Minuten
s	Sekunden
g	Fallbeschleunigung (9,81 m/s^2)
upm	Umdrehungen/min
v/v	Mischung über Volumeneinheiten
MG	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
E	Extinktion
T	Temperatur
^oK	Kelvingrade
^oC	Celsiusgrade
T_m	Phasenübergangstemperatur (Hauptumwandlung)
T_p	Phasenübergangstemperatur (Vorumwandlung)
K	Kondensation
(Δ)F	molekulare Fläche (Differenz von F)
π	Filmdruck im Monolayer
ΔH_m	molare Übergangsenthalpie der Hauptumwandlung
ΔH_p	molare Übergangsenthalpie der Vorumwandlung
ΔS	Übergangsentropie
$\Delta H_{v.H.}$	van't Hoffsche Reaktionsenthalpie
CU	Kooperativität eines Phasenübergangs
θ	Umwandlungsgrad
P_{rel}	relative Permeabilität
E_a	molare Aktivierungsenergie

i-,iso-FS	Fettsäure mit iso-Verzweigung
ai-,anteiso-FS	Fettsäure mit anteiso-Verzweigung
br-FS	Fettsäure mit Verzweigung
ω-cyc-FS	Fettsäure mit ω-Cyclohexanring
Chol	Cholesterin
THBH	Tetrahydroxybacteriohopan
HGL	Hopanglycolipid
Diplopterol	22-Hydroxy-29-hopan
PC, Lecithin	Phosphatidylcholin
PA	Phosphatidsäure

PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerin
DPG	Diphosphatidylglycerin
DAHPC	1,2-Dianteisoheptadecanoyl-phosphatidylcholin
DIHPC	1,2-Diisoheptadecanoyl-phosphatidylcholin
DCUPC	1,2-Di-ω-cyclohexylundecanoyl-phosphatidylcholin
DCDPC	1,2-Di-ω-cyclohexyldodecanoyl-phosphatidylcholin
DCTPC	1,2-Di-ω-cyclohexyltridecanoyl-phosphatidylcholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-phosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
DHPC	1,2-Diheptadecanoyl-phosphatidylcholin
DSPC	1,2-Distearoyl-phosphatidylcholin
DOPC	1,2-Dioleoyl-phosphatidylcholin

DC, DSC	Dünnschichtchromatographie
PSC	präparative Schichtchromatographie
GC	Gaschromatographie
MS	Massen-Spektroskopie
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie
ESR	Elektronen-Spin Resonanz-Spektroskopie
DTA	"Differential Thermal Analyses"
DSC	"Differential Scanning Calorimetry"
BLM	"Black Lipid Membranes"

B.a., B. acidocaldarius	Bacillus acidocaldarius
E.coli	Escherichia coli
A. laidlawii	Acholeplasma laidlawii
M.m., M.mycoides	Mycoplasma mycoides
M.o.	Methylobacterium organophilum

1. EINLEITUNG

Bakterienzellen sind von einer Membran umgeben, die eine Reihe wichtiger Funktionen erfüllt:

1. Sie stellt eine relativ impermeable Barriere für kleine Moleküle, Ionen und Protonen dar. Insbesondere garantiert sie den pH-Gradienten, der nach der Chemiosmotischen Theorie die ATP-Synthese treibt.

2. Zur Energiegewinnung orientiert sie die Atmungskette und einige der sie mit Reduktionsäquivalenten speisenden Enzyme.

3. Durch die orientierte Insertion von Permeasen ermöglicht sie enzymgebundene Transportprozesse (Import, Export).

4. Die Biosynthesen von extrazellulären Polymeren der Zellwand und von Kapseln sind teilweise in ihr lokalisiert; ebenso ist sie der Syntheseort von Phospho- und Glycolipiden.

5. Sie ist der Anheftungsort für Flagellen und wahrscheinlich auch für DNA-Stränge während der DNA-Synthese.

6. Punkt 4. und 5. beinhalten, daß sie eine wichtige Rolle bei der Koordinierung der Zellteilung spielt.

7. Sie dient der Kommunikation mit der Umwelt durch orientierte Rezeptorproteine und verarbeitet Außenreize.

Dieser Vielzahl von Aufgaben entsprechend, vereinigt die Cytoplasmamembran in sich eine Reihe von zum Teil widersprüchlichen Eigenschaften. So muß sie Stabilität und Flexibilität besitzen, muß molekülдicht und -durchlässig sein, muß zeitliche und räumliche Asymmetrien erlauben und muß in diesen Eigenschaften steuerbar sein.

Die typische Plasmamembran baut sich aus Proteinen und Lipiden mit kleineren Mengen an gebundenen Kohlehydraten auf. Das Verhältnis von Protein zu Lipid kann variieren. In Bakterienmembranen überwiegt oft die Proteinkomponente.
Die Lipidphase der Zellmembran setzt sich aus Neutrallipiden, Glycolipiden und Phospholipiden zusammen. In der Eukaryotenmembran findet man

noch Sterole, die mit wenigen Ausnahmen in Bakterien nicht auftreten.

Bei den Neutrallipiden handelt es sich um Di- und Triglyceride, die mit langkettigen Fettsäuren verestert sind. Die Gruppe der Glycolipide ist sehr heterogen und baut sich zum Beispiel aus Diglyceriden auf, an die Zuckerreste glycosidisch gebunden sind. Phospholipide sind ebenfalls mit Fettsäuren (Acylketten) veresterte Diacylglyceride, deren dritte OH-Gruppe mit Phosphorsäure verestert ist. Die Phosphorsäure kann ihrerseits wieder verestert sein, zum Beispiel mit Ethanolamin (PE), mit (N-Trimethyl)-ethanolamin (PC) oder mit Glycerin (PG).
Der große Teil der Membranlipide ist amphipathisch, d.h. sie bestehen aus einem polaren und einem apolaren Teil. Diese Doppelnatur der Moleküle zwingt sie in wässrigem Milieu zur Aggregatbildung und Strukturen, bei denen die Molekülteile gleichen physikalischen Charakters zueinander orientiert werden. In diesem "hydrophoben Effekt" (TANFORD, 1978) liegt die eigentliche Ursache der Membranstrukturbildung.

Die meisten Befunde und geforderten Eigenschaften sprechen im Augenblick für das Membranmodell von SINGER, NICOLSON (1972) und das sehr ähnliche Modell von CAPALDI, GREEN (1972). Dieses "fluid-mosaic"-Modell besteht aus einer Lipiddoppelschicht (Bilayer), in die Proteine eingebettet (integrale Proteine) oder angelagert (periphere Proteine) sind. Die Orientierung der Lipid- und Proteinmoleküle im Bilayer führt zu zwei stark polaren Grenzschichten, die eine unpolare Zwischenschicht umgeben.

Die Eigenschaften einer Membran werden durch die Lipide und Proteine in deren Zusammenwirken determiniert und sind stark von den physikalischen Zuständen abhängig, in denen sich die Moleküle befinden. PARDEE (1971) und GULICK-KRZYWICKI (1975) verglichen sie mit einer viskösen, heterogenen, doppelschichtigen Flüssigkeit, einem zweidimensionalen Flüssigkristall. Dieser Vergleich weist auf die "Fluidität" der Membran hin, die z.B. die laterale Diffusion und die Rotation von Lipiden und Proteinen in der Membran erlauben (POO, CONE, 1974; EDIDIN, FAMBROUGH, 1973).

Wesentliche Erkenntnisse über dieses Membranmodell wurden in künstlichen Membranen gefunden.
Die einfachste dieser "künstlichen Membranen" ist die Lipiddoppelschicht, die sich aus Lipiddispersionen in wässrigen Systemen nach Beschallen bilden. Vorzüge solcher künstlichen Systeme gegenüber natürlichen

Membranen bestehen in der Reduzierung von Komplexität, z.B. durch das Fehlen von Proteinen und die Möglichkeit des kontrollierten Aufbaus.

An solchen Lipiddoppelschichten wiesen CHAPMAN et al. (1967) mit Hilfe der Differentialkalorimetrie nach, daß Lipide eine endotherme, umkehrbare Strukturumwandlung vom Charakter kristallin/flüssig-kristallin durchmachen können.
Unterhalb des Phasenübergangs ordnen sich die Kohlenwasserstoffketten in der dichtestmöglichen Packung in einem zweidimensionalen Gitter (Gelphase, kristalline Phase) an. Die Acylketten befinden sich dabei in einer gestreckten Form (all-trans-Konformation). Durch Konformationsänderungen in den Kohlenwasserstoffketten wird der Phasenübergang von kristallin nach flüssig-kristallin ausgelöst. Die Kohlenwasserstoffketten verlieren dabei ihre dichte Packung und werden beweglicher, und die Zahl an gauche-Konformationen in den Acylketten erhöht sich sprunghaft (flüssig-kristalliner Zustand). Die Konsequenz daraus ist, daß sich die Fluidität im Membraninnern erhöht, aber ohne daß die Doppelschichtstruktur verloren geht (z.B. JAIN, 1980).
Die Phasenübergangstemperatur T_m ist von der Struktur des Lipids abhängig und hängt sowohl vom polaren Teil als auch von den Kohlenwasserstoffketten ab. Bei gleicher Kopfgruppe steigt die Phasenübergangstemperatur mit der Kettenlänge der Acylketten und wird durch Verzweigungen oder Doppelbindungen in ihnen erniedrigt (LADBROOKE, CHAPMAN, 1969; SILVIUS, MCELHANEY, 1979a,b).
Der Phasenübergang konnte auch in biologischen Membranen nachgewiesen werden (STEIM, 1968; STEIM et al., 1969; MELCHIOR et al., 1970; OVERATH et al., 1975; SACKMANN et al., 1973). Dies ist einer der vielen Beweise, daß zumindest Teile der Membranlipide in Doppelschichtstruktur vorliegen müssen (SHIPLEY, 1973).

In einer großen Zahl von Untersuchungen an natürlichen Membranen wurde nachgewiesen, daß biologisch wichtige Prozesse und Eigenschaften vom physikalischen Zustand der Lipidphase abhängen. Dazu gehören Stofftransportvorgänge, Enzymaktivitäten, osmotische Stabilität, das elektrophysiologische Verhalten und das Zellwachstum. Wegen dieser Abhängigkeiten scheinen Zellen zumindest auf einen teilweise flüssig-kristallinen Zustand in der Cytoplasmamembran angewiesen zu sein (ESFAHANI et al., 1971; De KRUYFF et al., 1973a); LINDEN et al., 1973; OVERATH, TRÄUBLE, 1973; OP DEN

KAMP et al., 1977; HUANG et al., 1974; SILVIUS et al., 1980a,b, SPRINGLE, CHAPMAN, 1981). MCELHANEY (1974) fand an Acholeplasma laidlawii, das mindestens 10% der Membranlipide in flüssig-kristallinem Zustand sein müssen, um geringes Wachstum zu garantieren.
Für poikilotherme Organismen, insbesondere für Bakterien, ergibt sich daraus das Problem der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen (z.B. Temperatur, Nährstoffangebot und Ionenmilieu), um optimale Eigenschaften aufrecht zu erhalten. Für eine Anzahl von nicht wärmeregulierten Tieren wurde die Lipidadaptierung an veränderte Umgebungsbedingungen nachgewiesen (WODTKE, 1981). Für Bakterien wurde sie u.a. für Bacillus- und Mycoplasma-Arten und für Escherichia coli nachgewiesen (AMELUNXEN, MURDOCK, 1978; SMITH, MILLER, 1980; HERBERT, 1981). Für Escherichia coli konnte vor kurzem der Mechanismus der temperaturabhängigen Bildung der cis-Vaccensäure aufgeklärt werden (DE MONDOZA, CRONAN, 1983).

Lipidadaptierungen führen zu Veränderungen in der Lipidkopfgruppe und in der Zusammensetzung der Acylketten (SMITH, MILLER, 1980; HERBERT, 1981). Schon die Beobachtungen von HEILBRUNN (1924) und BELEHRÁDEK(1937) hatten gezeigt, daß Temperaturerhöhungen zu dem vermehrten Einbau höher schmelzender Fettsäuren führt. Umgekehrt wurde in Bakterienmembranen gezeigt, daß Temperatursenkung zu einem Anstieg von verzweigten, kürzerkettigen und ungesättigten Fettsäuren führen kann (z.B. HERBERT, 1981; LANGWORTHY, 1982).
In der Eukaryotenzelle sind noch Cholesterin oder ähnliche Sterole ein ubiquitärer Membranbestandteil. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen über die Rolle von Cholesterin in Membranen schließen DEMEL, DE KRUYFF (1976), daß es sich um einen effektiven Regulator der Membranfluidität handelt. Zusammenfassend beschreiben DEMEL, DE KRUYFF (1976) seine Wirkung oberhalb des Phasenübergangs als eine Senkung der Fluidität; es wirkt also z.B. der Temperatur entgegen, indem es die Beweglichkeit der Lipidmoleküle einschränkt und die intermolekularen Kräfte erhöht.

Für die von Ausnahmen abgesehen cholesterinfreien Membranen von Bakterien sagten ESSER, SOUZA (1974) voraus, daß die Temperaturobergrenze, an die sich ein betroffenes Bakterium noch adaptieren kann, dort ist, wo seine gesamte Lipidphase in flüssig-kristallinem Zustand ist. Daraus ergab sich eine Forschungsrichtung, deren Ziel es war, die Temperaturanpassung über eine erhöhte Phasenübergangstemperatur der Membranlipide zu beweisen.

Dieser Ansatz wurde widerlegt durch den Befund von MCELHANEY, SOUZA (1976), daß die Obergrenze des Phasenübergangs nicht die maximale Wachstumstemperatur darstellt. Sicher ist, aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Fettsäuremusters, daß die Zusammensetzung der Membranlipide für die Thermostabilität und Funktion der Membran von großer Bedeutung sein muß. Aber der durch sie determinierte Übergang von der Gelphase zur flüssig-kristallinen Phase legt nicht die Wachstumsgrenze des Organismus fest (AMELUNXEN, MURDOCK, 1978).
Eine weitgehend konstante Fluidität im Wachstumsbereich von Escherichia coli ließ SINENSKY (1974) das Prinzip der "homeoviskosen Adaption" formulieren, das auch durch Untersuchungen an Bacillus stearothermophilus und Acholeplasma laidlawii seine Bestätigung zu finden scheint (ESSER, SOUZA, 1976).

Untersuchungen an Acholeplasma laidlawii legen allerdings den Schluß nahe, folgt man SILVIUS et al. (1980b), daß weniger die Fluidität als solche reguliert wird, sondern daß nur der flüssig-kristalline Zustand die anzusteuernde Größe sei. Nach den Befunden der letzten Jahre scheint aber keineswegs klar, ob nicht die grundlegende Idee der optimalen Fluidität nach wie vor Gültigkeit hat. So ist Domänenbildung in der Membran nachgewiesen, deren physikalische Zustände noch weitgehend unverstanden sind, die aber Mikrobereiche optimaler Fluidität nicht ausschließen (JAIN, WHITE, 1977; COSSINS, 1981). Es mehren sich außerdem die Befunde, daß die Fluidität, die Zellen für Wachstum tolerieren, eine Obergrenze hat. So wurde für Acholeplasma laidlawii, Bacillus stearothermophilus und Yersinia enterocolitica bei der Supplementierung von Lipiden, deren Phasenübergänge zu niedrig lagen, kein oder nur wenig Wachstum beobachtet (MELCHIOR, 1982). Hier ist auch interessant, daß WIESLANDER et al. (1980) die Kontrolle der Lipidzusammensetzung im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Bilayerstruktur sehen.

Zusammenfassend ließe sich sagen, daß die Temperaturadaptation der Membranlipide nur insoweit verstanden wird, als sie die Integrität der Membran und alle wesentlichen physiologischen Leistungen (z.B. Enzymaktivität und Permeabilität) in dem entsprechenden Milieu garantiert. Weitgehend unklar sind kausale Zusammenhänge, ist die Leistung der einzelnen Lipidsorten, ihr Zusammenspiel mit den die Membran konstituierenden Lipidklassen und Proteinen und die innere Dynamik von Regulationsprozessen bei stabiler Umwelt, aber noch viel mehr bei sich ändernden Bedingungen.

Die vorliegende Arbeit versucht, einen Beitrag zu dem Problemkomplex der Zellabgrenzung durch Lipid-Lipid-Wechselwirkungen zu liefern, indem sie einen Teil der membrankonstituierenden Lipide aus Bacillus acidocaldarius in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Die an reinen Lipiden gefundenen Daten sind dabei eine Voraussetzung für ein wirkliches Verständnis von Molekülinteraktionen und -dynamik in adaptiven Prozessen.

Bacillus acidocaldarius ist ein thermoacidophiles, sporenbildendes Stäbchen, das optimal bei pH 3 und 60°C wächst und von DARLAND, BROCK (1971) aus heißen, sauren Quellen isoliert wurde. Von DE ROSA et al. (1971a) wurde für ihn ein Wachstum zwischen pH 2-5 und 50 bis 70°C beschrieben. Nach den Beobachtungen an den Bacillus acidocaldarius Stämmen der eigenen Arbeitsgruppe und Neuisolaten umfaßt das Wachstumsintervall zumindest noch pH 6 und 40°C (HIPPCHEN et al. 1981).
Entsprechend der rauhen Lebensweise ist die Bacillus acidocaldarius-Membran aus einer Reihe von ungewöhnlichen Bausteinen zusammengesetzt. LANGWORTHY et al. (1976) fanden, daß nach Wachstum bei pH 3 und 60°C sie sich aus 15,7% Neutrallipiden, 64% Glycolipiden und aus 20,3% sauren Lipiden zusammensetzt. Etwa 30% der Glycolipide bestehen aus 1,2,3,4-Tetrahydroxypentan-29-hopan und 1-(O-N-Acyl-glucosaminyl)-2,3,4-tetrahydroxpentan-29-hopan. Diese Verbindungen gehören zur Klasse der pentacyclischen Triterpenoide. Die restliche Glycolipidfraktion besteht aus Mono- und Diacylglyceriden mit verschiedenen Zuckerresten. In der sauren Fraktion ist vor allem das mit 43% gefundene Sulfonoglycosyldiacylglycerol auffällig. Der Rest sind Phospholipide, vor allem Diphosphatidylglycerol (DPG) und Phosphatidylglycerol (PG). Die gebundenen Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion bestehen zu 65% aus ω-Cyclohexanfettsäuren von der Kettenlänge $C_{17:0}$ und $C_{19:0}$ und zu 32% aus verzweigten Fettsäuren (iso, anteiso) der Kettenlänge $C_{15:0}$, $C_{16:0}$ und $C_{17:0}$ (DE ROSA et al., 1971b; LANGWORTHY et al., 1976).

Für das Cytoplasma von Bacillus acidocaldarius bestimmten KRULWICH et al. (1978) einen pH-Wert von 5,8 bis 6,3. Die Membran von Bacillus acidocaldarius muß demnach eine effektive Barriere gegen Protonen darstellen.

Die Protonenpermeabilität steigt nach ROSSIGNOL et al. (1982) linear mit der Membranfluidität an. Da auch die Fluidität in der hydrophoben Phase der Membran mit der Temperatur zunimmt (z.B. JAIN, 1980), muß bei thermoacidophilen Organismen die Membran so gebaut sein, daß sie den Einstrom

von Protonen verhindert oder zumindest stark herabsetzt. Ein Studium der die hydrophobe Phase konstituierenden Membrankomponenten sollte also einen Beitrag zu der Frage liefern, welche Mechanismen bei Bacillus acidocaldarius einen übermäßigen Protoneneinstrom verhindern.

Es lag nahe, nach der Hypothese von ESSER, SOUZA (1974) die Membranlipide auf einen entsprechend angehobenen Phasenübergang hin zu untersuchen, der bei den Wachstumsbedingungen noch einen gewissen Ordnungsgrad in den Acylketten garantieren konnte. Diese Annahme wurde von BLUME et al. (1978) aufgrund von Fluoreszenzdepolarisationsmessungen an Bacillus subtilis-Lipiden ausgeschlossen. Diese mit 70-80% ω-Cyclohexanfettsäuren oder verzweigten Fettsäuren angereicherten Lipide - in der Größenordnung entsprachen sie damit der Konzentration in Bacillus acidocaldarius-Membranen - zeigten schwache Phasenübergänge bei 10°C bzw. zwischen 18 und 20°C. Darüber hinaus fand DREHER (1978) in Bacillus acidocaldarius-Lipiden mit der Fluoreszenzdepolarisationsmethode keinen Phasenübergang zwischen 0 und 70°C, mit den Lipiden im Gesamtmeßintervall in der flüssig-kristallinen Phase.

ROHMER et al. (1979) diskutierten die Rolle von Hopanoiden als Sterolanaloge und als phylogenetische Vorläufer von Sterolen. Tatsächlich konnte in eigenen Messungen an 1,2-Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und an Membranlipiden aus Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus acidocaldarius und Ei-PC mit Hilfe der Monolayertechnik gezeigt werden, daß Hopanoide kondensierend wirken, ein Befund, der bis dahin im wesentlichen nur von Cholesterin und verwandten Verbindungen bekannt war (PORALLA et al., 1980, KANNENBERG et al., 1980, KANNENBERG, 1979).

Diese Befunde in den schlecht definierten biologischen Lipidgemischen legten es nahe, den Effekt an synthetischen Lipiden mit verzweigten Fettsäuren und ω-Cyclohexanfettsäuren genauer zu untersuchen.
Diese Arbeit beschränkt sich dabei auf Phosphatidylcholine mit gleichlangen Kohlenwasserstoffketten, um die Wirkung von geraden und verzweigten Fettsäuren mit der von ω-Cyclohexanfettsäuren vergleichen zu können.
Ziel der Arbeit war die Messung von Molekülpackungsdichten, der Phasenübergangstemperatur und der Übergangsenthalpie, der Permeabilität von ungeladenen Molekülen in Membranmodellen aus reinen Lipiden und Lipidgemischen, sowie der Wachstumsverlauf von Mycoplasmen-Kulturen bei Zufütterung von Hopanoiden.

Im Monolayer-Membranmodell sind die molekularen Flächen und Packungsdichten von Lipiden und Lipidmischungen direkt zu bestimmen, so daß die intermolekularen Wechselwirkungen abschätzbar werden.

Als Bilayer-Membranmodell wurden handgeschüttelte Liposomen untersucht, die sich spontan aus Lipiden in wässrigen Suspensionen bilden (LUZATTI, 1968; CHAPMAN, 1966; BANGHAM, 1963).
Im "Differential-Scanning-Calorimeter" zeigen Liposomendispersionen den besprochenen Phasenübergang von kristallin nach flüssig-kristallin. Aus dieser Technik werden die Phasenübergangstemperatur und die thermdynamischen Daten Enthalpie und Entropie zugänglich, die Rückschlüsse auf zwischenmolekulare Kräfte erlauben.
BANGHAM et al.(1967b) wiesen Liposomen außerdem als beinahe ideale Osometer aus. Diese Eigenschaft erlaubt die Messung von Nichtelektrolytpermeabilitäten, die direkte Aussagen über die Barrierefunktion der entsprechenden Lipiddoppelschichten erbringen.

Als biologisches Modellsystem wurde Mycoplasma mycoides benutzt.
Mycoplasma mycoides ist ein zellwandfreier Prokaryot, der die Stabilität seiner Membran zumindest teilweise mit supplementiertem Cholesterin als Membrankomponente aufrecht erhält. Zur Eigensynthese von Cholesterin ist er unfähig.
Es wurde daher versucht, anstelle von Cholesterin Hopanoide zu füttern. Wegen der abgestimmten Zusammensetzung der Membran eines Organismus sind die Anforderungen an ein Membranmolekül in diesem Versuch sehr spezifisch.

Das von uns bearbeitete Problem läßt sich damit in folgende Teilkomplexe auflösen:

1. Welchen Einfluß haben sterische Besonderheiten am Acylkettenende, wie Verzweigungen und Cyclohexanringe, von Phosphatidycholin auf die molekulare Packung, den Flächenbedarf, die zwischenmolekularen Kräfte und die Permeabilität?
2. Welchen Einfluß haben Hopanoide auf Membranen?
3. Können Hopanoide in Mycoplasmen Cholesterin ersetzen und sind sie damit funktionelle Analoga zu Sterolen?

Wir gehen davon aus, daß sich aus diesen Fragestellungen ein verbessertes Verständnis der Adaptationsleistungen von Bacillus acidocaldarius ergibt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Difco-Laboratories:
- Bacto-Yeast Extract
- Bacto-Agar
- Bacto-Peptone
- Bacto-Heart-Infusion Broth

Von Merck AG:
- Kieselgel H nach Stahl (Typ 60)
- (P)DC - Fertigplatten Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator

Von Pharmacia Fine Chemicals AG:
- Sephadex G 25
- Sephadex LH 20

Von Maizena GmbH, Heilbronn:
- D-Glucose-Monohydrat, kristallin

Von Serva Feinbiochemica GmbH:
- Ampicillin krist. pharm.
- Servacel Typ DEAE 23 SH
- Kieselgel Mallinckrodt (- 100 mesh) nach Ramsay und Patterson

Von Sigma Chemical Company:
- Albumin, fettsäurefrei aus Fraktion V Albumin
- Palmitinsäure (99%)
- Elaidinsäure (99%)
- Oleinsäure (99%)
- Desoxyribonucleinsäure, Natriumsalz
- Cholesterin (> 99%)
- Ampicillin, Natriumsalz
- 4,5-Dihydroxynaphtalene-2,9-disulfonic Acid (Chromotropic Acid)

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin
1,2-Diacyl-sn-glycoro-3-phosphorylethanolamin aus E.coli
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphat
1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (Ei-PC) aus Hühnereigelb
1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphat (Ei-PA) aus Hühnereigelb

Von Firma Carl Roth, Karlsruhe:
Berberinchlorid-Dihydrat

Von Calbiochem-Behring GmbH:
Cholesterin (> 99%)

Von Fluka AG:
1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin

Von Boehringer Mannheim GmbH:
Phospholipase D aus Weißkohl

Von Dr. L. Vértesy, Hoechst AG, Frankfurt/Main:
22-Hydroxy-29-hopan (Diplopterol)

Von Dr. M. Rohmer, Ecole National Supérieure de Chimie, Mulhouse, France:
22-Hydroxy-29-hopan (Diplopterol)

Von Dr. G. Winkelmann, Universität Tübingen:
Herbicolin

Von Dr. Hansjörg Eibl, Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen:
1,2-Di-ω-cyclohexyldodecanoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (DCDPC)

Von Dr. Ronald N. McElhaney, Department of Biochemistry, Alberta, Canada:
1,2-Diisoheptadecanoyl - sn-glycero-3-phosphorylcholin (DIHPC)
1,2-Dianteisoheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (DAMPC)

Die Synthese von DCDPC und die physikalische und chemische Charakterisierung sind in BENZ et al. (1983) beschrieben. Das Präparat war chromatographisch sauber und einheitlich (R_f = 0,49; Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 v/v)
DIHPC und DAHPC sind von SILVIUS, McELHANEY (1979 a,b) beschrieben und charakterisiert worden. Beide Präparate waren chromatographisch sauber und einheitlich (beide Lipide liefen mit gleichem R_f-Wert von R_f = 0,32; Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4 v/v).

Das verwendete Ei-PC hatte folgende Acylketten-Zusammensetzung:[1)]

Fettsäure	Gesamtgehalt in (%)
16:6	33,0
16:1	2,2
18:0	8,8
18:1	36,8
18:2	16,1
20:2	1,9

2.2. Organismen

Bacillus acidocaldarius Stamm 104-IA (DARLAND, BROCK, 1971):
Dr. T.D. Brock

Mycoplasma mycoides var. capri PG 3/1:
Dr. E.A. Freundt, Institut of Medical Microbiology, University Aarhus, Denmark

Methylobacterium organophilum: DSM 760

Ich danke allen Herren für die Überlassung der Stämme.

2.3. Nährmedien

Für Bacillus acidocaldarius (Sporulationsmedium nach DARLAND, BROCK, 1971):

0,2 g $(NH_4)_2SO_4$
0,5 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
0,25 g $CaCl_2 \times 2H_2O$
3 g KH_2PO_4
2 g Glucose

---

1) Die Untersuchungen wurden von Herrn Härtner ausgeführt.

2 g Hefeextrakt
2 g lösliche Stärke
1 ml Spurenelemente Stammlösung auf 1 l entionisiertes Wasser

Spurenelemente-Stammlösung:

0,28 g $FeSO_4 \times 7H_2O$
1,25 g $MnCl_2 \times 4H_2O$
0,4 g $ZnCl_2 \times 7H_2O$
auf 1 l entionisiertes Wasser

Vor dem Autoklavieren wurde die Lösung mit 6 N H_2SO_4 auf pH 4 eingestellt.

Für Methylobacterium organophilum (PATT, HANSON, 1978):

1 g KNO_3
0,2 g $MgSO_4 \times 7H_2O$
0,5 g $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$
0,07 g NaH_2PO_4
10 ml Stammlösung auf 1 l entionisiertes Wasser

Stammlösung:

2,65 g $CaCl_2 \times 2H_2O$
5 g $FeSO_4 \times 7H_2O$
1,3 g $CuCl_2 \times 2H_2O$
1 mg H_3BO_3
1 mg $MnSO_4 \times 5H_2O$
1 mg MoO_3
7 mg $ZnSO_4 \times 7H_2O$
auf 1 l entionisiertes Wasser

Die Lösung wurde auf pH 6,8 eingestellt und nach dem Autoklavieren wurden 5 ml Methanol zugesetzt.
Für Platten wurden dem Medium 2% Bacto-Agar zugesetzt.

Für Mycoplasma mycoides var.capri (RAZIN, ROTTEM, 1976):

13 g Heart-Infusion-Broth
5 g Pepton
7 g Hefeextract
20 mg Na-Deoxyribonucleat

2,5 g NaCl
960 ml entionisiertes Wasser
Die Suspension wurde gerührt, bis eine klare Lösung entstand, auf pH 8 eingestellt und autoklaviert.
10 ml Glucoselösung (50 g/100 ml entionisiertes Wasser)
10 ml K_2HPO_4 (24 g/100 ml entionisiertes Wasser)
Glucose- und K_2HPO_4Lösung wurden getrennt autoklaviert und steril zupipettiert.

10 ml Serum-Albumin (5 g/10 ml entionisiertes Wasser)
10 ml Ampicillin-Natrium (300 mg/10 ml entionisiertes Wasser)
Albumin und Ampicillin wurden nach Sterilfiltration eingesetzt.

1 ml Palmitinsäure (25 mg PA/ 5 ml Ethanol)
1 ml Elaidinsäure (25 mg EA/ 5 ml Ethanol)
1 ml Cholesterinlösung (10 mg Cholesterin/ 1 ml Ethanol)

Die ethanolischen Lösungen wurden steril hinzupipettiert.

Zur Kultivierung auf Platten wurde dem Medium 10 g Bacto-Agar zugesetzt.

2.4. Tetrahydroxybacteriohopan- und Hopanglycolipidisolierung aus Bacillus acidocaldarius-Kulturen und deren Charakterisierung

2.4.1. Anzucht der Zellen

2.4.1.1. Schüttelkulturen

Die Schüttelkulturen (Schüttelmaschinen: Infors Typ WTR-1 und RC TK, Infors AG) wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane ausgeführt. Bei 120 upm und 50°C wurde für 24 h inkubiert. Angeimpft wurden 100 ml mit 0,2 ml einer logarithmisch gewachsenen Kultur. Beim Animpfen mit aufbewahrten Zellen (2 Teile Zellsuspension auf 1,5 Teile Glycerin 87%ig, bei -25°C) wurde mit dem Inhalt eines Glycerinröhrchens auf 100 ml für 48 h bei den angegebenen Bedingungen inkubiert.

2.4.1.2. Zellanzucht im Fermenter

20 l - Fermenter (Modell C 6, Biolafitte) wurden mit 14,5 l Medium gefüllt und 30 min bei 134°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde mit 500 ml einer 24 h alten Vorkultur angeimpft und bei 50°C, 300 upm Rührgeschwindigkeit (Blattrührer) und 33,3 l Luft/min fermentiert. Durch Zugabe einiger Tropfen Silikon-Antischaum wurde die Schaumentwicklung verhindert. Geerntet wurde nach 24 h.

Im 100 l - Fermenter (Modell Fermacell NB 100) wurden 98 l B.a.-Medium 60 min bei 120° sterilisiert und nach dem Abkühlen mit 2 l einer 24 h alten Schüttelkultur angeimpft. Inkubiert wurde 24 h bei 50°C, 150 upm (Blattrüher) und 1700 l Luft pro Stunde. Die Schaumentwicklung wurde durch Zugabe von 50%igem Polyol verhindert.

2.4.2. Aufarbeitung der Zellsuspension

Die Kulturflüssigkeit wurde in der Milchzentrifuge von den Zellen getrennt und letztere weiter in der Sorvall RC 2-D Zentrifuge konzentriert. Die entstehende Zellpaste wurde eingefroren und gefriergetrocknet (Leybold-Heraeus GT 2).

2.4.2.1. Lipidextraktion

Gefriergetrocknete Zellen von B.a. wurden nach einer modifizierten Methode von BLIGH, DYER (1959) extrahiert. Die Lipide wurden mit 100 ml Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0,8 v/v) aus 15 g getrockneten Zellen unter ständigem Rühren (1,5 h) extrahiert. Die Zellen wurden bei 3000 g abzentrifugiert und in 100 ml Lösungsmittel resuspendiert; die Extraktion wurde auf diese Weise dreifach wiederholt.
400 ml der vereinigten Extrakte wurden mit je 105 ml Chloroform und Wasser versetzt, geschüttelt und die entstehende Emulsion bei 3000 g in der Zentrifuge getrennt.
Die Unterphase wurde zur Trockne eingeengt und im Exsikkator bei 5°C aufbewahrt.

2.4.2.2. Entfernung von Nichtlipidanteilen

Die Nichtlipidanteile wurden nach der Methode von WELLS, DITTMER (1963) an einer Sephadex G 25 - Säule abgetrennt.
Die vereinigten Eluate wurden zur Trockne eingeengt.

2.4.2.3. Trennung der Gesamtlipide in Lipidklassen

Die Trennung erfolgte nach einer veränderten Methode von LANGWORTHY et al. (1976) und ROUSER et al. (1969).
Das von hydrophilen Teilen gereinigte Gesamtlipid wurde in Chloroform suspendiert und durch einen Faltenfilter (Selecta Nr. 595 1/2 Ø 185 mm, Schleicher & Schüll) von unlösbaren Bestandteilen gereinigt.
Die verschiedenen Lipidklassen wurden mit einer Kieselgel Mallinckrodt-Säule (2,0 x 60 cm Glassäule mit Teflonhahn) getrennt.
Gegen den Hahn wurde die Säule mit einem Pfropfen aus Glaswolle geschlossen. 15 g Kieselgel wurden, wie bei ROUSER et al (1969) beschrieben, aktiviert (2 h bei 105°C), in die Säule gepackt und mit zwei Säulenvolumen Chloroform gewaschen. Ca. 5 g aktiviertes Kieselgel wurde in der Lipidlösung suspendiert und nach Adsorption der Lipide der Kieselgelsäule überschichtet. Beladen wurde mit dem Extrakt aus 60 g Zellen.
Eluiert wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Minipuls 2, Firma Gilson) mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Die verwendeten Schläuche waren aus Teflon. Die Schlauchpumpe wurde mit Acidflex (Chloroform), Silicon (Aceton) und Solvaflex (Methanol) betrieben.
Eluiert wurden die Neutrallipide mit Chloroform (30 Säulenvolumen ca. 500 ml), die Glycolipide mit Aceton (40 Säulenvolumen ca. 600 ml) und die sauren Lipide mit Methanol (10 Säulenvolumen ca. 180 ml).

2.4.2.4. Alkalische Hydrolyse der Glycolipide

Die Glykolipidfraktion wurde in 3 M methanolischer KOH 1 h am Rückfluß verseift (FÖRSTER et al., 1973). Die Lipidkonzentration betrug 0,5 mg/ml methanolischer KOH.

Das Unverseifbare wurde in mehreren Portionen mit Diethyläther extrahiert (etwa 500 ml Äther bei 150 mg Lipid). Zur Phasentrennung wurden zu den Methanol-Äther-Gemischen geringe Mengen Wasser zugesetzt.

Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit halbgesättigter Na_2CO_3-Lösung (ca. pH 11) gewaschen und zur Trockne eingeengt.
Ein sich bildendes Öl kann mit Chloroform/Methanol (2:1 v/v) oder mit Ethanol zur Trockne eingeengt werden.
Der Niederschlag wurde bei 5°C im Exsikkator aufbewahrt.

2.4.2.5. Fällung der Hopanoidfraktion

Die getrocknete Fraktion aus Unverseifbarem wurde in Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0,8 v/v) gelöst. Der Niederschlag geht nur sehr langsam in Lösung und muß länger gerührt werden. Bei vorsichtigem Einengen am Rotationsverdampfer (Wasserbad 35°C) bildet sich infolge von Polaritätsverschiebung des Lösungsmittels ein weißer, flockiger Niederschlag. Der Niederschlag wurde im Glas- oder Metallbecher abzentrifugiert und der Überstand weiter eingeengt. Ein erneuter Niederschlag wurde ebenfalls abzentrifugiert. Bereits der zweite Überstand enthielt keine DC nachweisbaren Mengen an Hopanoiden.
Der Niederschlag wurde bei 5°C im Exsikkator getrocknet. Es entsteht ein kompakter, wasserheller, transparenter Film im Zentrifugenglas.

2.4.2.6. Präparative Schichtchromatographie

DC- und PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator; 0,25 und 2 mm Schichtdicke, Merck AG) wurden vor Gebrauch in Chloroform/Methanol/Wasser (60:10:1 v/v) gewaschen, getrocknet und anschließend bei 105°C für 1 h aktiviert.
Benutztes Laufmittelsystem war: Chloroform/Methanol/Diäthyläther/Wasser (60:10:10:1 v/v).
0,25 mm starke Platten wurden mit 1,5 bis 2 mg Lipid beladen und 2 mm PSC-Platten mit bis zu 100 mg.
Aufgetragen wurden die gelösten Lipide aus einer 100 µl Spritze, an deren Kanülenende ein dünner Teflonschlauch befestigt war. Mit Hilfe einer selbst

gebauten Auftrageapparatur lag der Teflonschlauch elastisch dem Kieselgel an und vermied so ein Zerkratzen der Oberfläche.
Entwickelt wurden die Platten im genannten Laufmittel drei Mal (HALPAAP, 1963, 1965).
Identifiziert wurden die Lipidbanden durch Joddämpfe und durch Anfärben eines Plattenstreifens mit Schiff-Reagenz.

2.4.2.7. Extraktion der Lipide von den präparativen Platten

Die ausgekratzten Kieselgel 60 Banden wurden mit Chloroform/Methanol (2:1 v/v) während 15minütigem Rühren extrahiert und die Lipidlösung mittels Papierfilter (Selecta 595 1/2, Schleicher & Schüll) abgetrennt. Durch Filtration über eine D 4 Glasfritte wurden Kieselgelspuren entfernt. Alle sich der Hapanoidfällung anschließenden Arbeitsgänge wurden mit frisch destillierten Lösungsmitteln ausgeführt. THBH lag nach der Extraktion chromatographisch sauber vor. HGL war minimal mit THBH verunreinigt.
Die gereinigten Substanzen wurden bei -20^0 im Exsikkator gelagert.

2.4.2.8. Verkürztes Verfahren zur Isolierung von HGL[1)]

Ein verkürztes Verfahren zur Isolierung von HGL hat sich als ganglar erwiesen. Die Ausführung der Isolierungsschritte entspricht den oben beschriebenen Verfahren. Die ungereinigten Gesamtlipide werden verseift und mit Äther extrahiert.
Die Ätherfraktion wird direkt an der Kieselgel-Säule aufgetrennt und die Glycolipidfraktion auf PSC-Platten entwickelt. Das extrahierte HGL war chromatographisch sauber.

---

1) Ich danke Herrn Härtner für das auf diese Weise isolierte Hopanglycolipid.

2.4.3. Dünnschichtchromatographische Charakterisierung

2.4.3.1. Verwendete Laufmittelsysteme

Verwendet wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (0,25 mm Schichtdicke ohne Fluoreszenzindikator; Merck AG). Die Platten wurden vor Gebrauch 1 h bei 105° aktiviert.
Entwickelt wurden die Platten ein- und zweidimensional mit Laufmittelsystemen von LANGWORTHY et al. (1976), MINNIKIN et al. (1972) und RÖLL (1981).

Chloroform/Methanol/Wasser (60:10:1 v/v)
Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4 v/v)
Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (80:13:8:0,3 v/v)

2.4.3.2. DC-Nachweismethoden

- Nachgewiesen wurden die Lipide mit 40%iger H_2SO_4, Wasser- oder Joddämpfen.
- Perjodat-Schiff Reagenz für Glycolipide und vicinale OH-Gruppen (KATES, 1972): DasTHBH und das Hopanglycolipid werden innerhalb weniger Minuten als rotviolette Flecken sichtbar. Innerhalb von 12 Stunden färbt sich die gesamte Glycolipidfraktion, in Farbe und Größe gut differenzierbar, aus.
- Molybdatoschwefelsäure zum Nachweis von Phospholipiden nach SKIPSKI, BARCLAY (1969): durch leichtes Ansprühen mit Molybdatoschwefelsäure erscheinen Phospholipide sofort als blaue Flecken. Durch 30- bis 60minütiges Erhitzen werden die Restlipide ebenfalls sichtbar.

2.4.4. Physikalische Charakterisierung und Reinheitsprüfung

2.4.4.1. Gaschromatographische Untersuchung[1)]

Acetyliertes THBH wurde im Gaschromatographen 1440 der Firma Varian Aerograph untersucht.

1) Die GC-Untersuchungen wurden z.T. von Herrn Karl Nill ausgeführt.

Die GC-Säule war mit OV-1 (3%ig auf Gaschrom Q; 100-120 mesh) gefüllt.

Chromatographiebedingungen:

a) Strömungsgeschwindigkeiten:
   Stickstoff 25 ml/min
   Wasserstiff 25 ml/min
   Luft 300 ml/min

b) Betriebstemperaturen:
   Injektor 340°C
   Detektor 340°C

Das Gerät ist mit einem Flammenionisationsdetektor ausgestattet. Als Lösungsmittel wurde n-Hexan verwendet; nach SCHENK, FRITZ (1959) wurde THBH acetyliert.

2.4.4.2. Massenspektroskopische Untersuchungen

Um den störenden Einfluß von ausblutenden GC-Säulen zu vermeiden, wurde das acetylierte THBH direkt im Massenspektrographen des GC/MS-Geräte: verdampft.
Ich danke den Herren Dr. Spitzner, Org.Chem. Institut der Univ. Stuttgart-Hohenheim, und Dr. Zeller, Inst. für Org. Chemie der Univ. Tübingen, für die Untersuchung von THBH bzw. HGL.

2.5. Diplopterol-Isolierung aus Methylobacterium organophilum[1)]

2.5.1. Kultivierung von Methylobacterium organophilum

2.5.1.1. Schüttelkulturen

Für Schüttelkulturen (Schüttelmaschinen Modelle Infors Typ WTR-1 und RC 1TK, Infors AG) wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane verwendet. Inkubiert wurde bei 120 upm bei 30° für 12 h.

---

1) Kultivierung der Zellen und Isolierung von Diplopterol wurden von Herrn Härtner ausgeführt.

Angeimpft wurden 100 ml Medium mit 5 ml logarithmisch gewachsener Vorkultur.
Von Methylobacterium aus konservierten Stämmen (Kieselgelröhrchen) wurden zwei Verdünnungsausstriche gemacht (30°C, 48 h) und von der zweiten Platte eine Kolonie submers angezogen. Letztere war Vorkultur für alle weiteren Schüttelkulturen.

2.5.1.2. 10 l Fermentation

10 l Medium wurden im Fermenter (Modell C 6, Biolafitte) 30 min bei 134°C autoklaviert. Anschließend wurde mit 1 l einer "Ober-Nacht-Kultur" von Methylobacterium steril angeimpft. Inkubiert wurde bei 300 upm, 30°C und 125 l/h Luft. Geerntet wurde in der späten logarithmischen Phase. Zur Verhinderung von Schaumbildung wurden einige Gropfen Antischaum zugesetzt.

2.5.2. Isolierung von Diplopterol

2.5.2.1. Lipidextraktion

Die Zellen wurden unter Kühlung in der Sorvall RC-2 Zentrifuge abgetrennt und aus der nassen Zellpaste die Lipide extrahiert.
40 g wurden mit 200 ml Methanol/Chloroform (2:1 v/v) versetzt und 4 h unter Rühren extrahiert. Die Zellrückstände wurden abzentrifugiert und zweimal mit je 200 ml Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0,8 v/v) 30 min erneut extrahiert.
Die vereinigten organischen Phasen wurden auf das doppelte Volumen verdünnt. Nach der Zugabe von je 300 ml Wasser und Chloroform trat über Nacht Trennung in zwei Phasen auf.
Die Chloroformphase wurde bis zur Trockne eingeengt (u.U. unter Zusatz von Ethanol) und bei 5°C im Exsikkator gelagert.

2.5.2.2. Alkalische Hydrolyse

Die Lipidfraktion wurde in 150 ml 2 N methanolischer KOH gelöst und 1 h unter Rückfluß verseift.

Nach dem Abkühlen wurde die methanolische Lösung mit 50 ml Wasser versetzt und drei Mal mit 100 ml Diethyläther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden mit 50 ml Wasser gewaschen und zur Trockne eingeengt. Um starke Schaumbildung zu vermeiden, mußte der Ätherfraktion noch Chloroform/Methanol (2:1 v/v) oder Benzol zugesetzt werden.

2.5.2.3. Auftrennung des Unverseifbaren

2.5.2.3.1. Trennung über DC-Platten

Kleine Mengen wurden über Kieselgel 60 Platten (20 x 20, 0,25 mm Schichtdicke ohne Fluoreszenzindikator, Firma Merck) gereinigt. Die Platten wurden mit Dichlormethan gewaschen und 1 h bei 105°C aktiviert.
Wie für die B.a.-Lipide schon beschrieben, wurde die gelöste Lipidfraktion ohne Beschädigung der Plattenoberfläche aufgebracht und zweimal in Dichlormethan entwickelt. Die Lage der Lipidbande wurde am Plattenrand mit Berberinchlorid sichtbar gemacht und abschließend aus dem Kieselgel ausgekratzt, mit Chloroform/Methanol (2:1 v/v) eluiert und das Kieselgel mit einer D 4 Glasfritte entfernt. Das zur Trockne eingeengte Produkt war chromatographisch reines Diplopterol.

2.5.2.3.2. Trennung an Kieselgel

Aktiviertes Kieselgel Mallinckrodt wurde nach Aufschlämmung in Dichlormethan in eine Glassäule gefüllt (2,0 x 12,0 cm). Die in Dichlormethan gelöste Lipidfraktion aus 40 g Zellen wurde dem Kieselgel überschichtet und die Diplopterolfraktion mit einem Säulenvolumen Dichlormethan eluiert. Mit weiteren drei Säulevolumen Dichlormetan wurde nachgewaschen und die Fraktionen vereinigt. Die zur Trockne eingeengte Fraktion enthielt chromatographisch sauberes Diplopterol.

2.5.3. Charakterisierung mittels DC-Platten

Zur Prüfung auf Reinheit und zur Charakterisierung wurden die Isolate ein- und zweidimensional dünnschichtchromatographisch getestet.

Laufmittel eindimensional:
Dichlormethan

Laufmittel zweidimensional (zur Prüfung auf vorhandene Glycolipide):
Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4 v/v) (MINNIKIN et al. 1972)
Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser (80:13:8:0,3 v/v) (RÖLL, 1981).
Mit einer 0,1%igen Berberinchlorid-Dihydrat-Lösung (Ethanol/Wasser 95:5 v/v) war Diplopterol in langwelligem UV-Licht als gelber fluoreszierender Fleck sichtbar (ROHMER, pers. Mitteilung).

2.6. Versuche mit Mycoplasma mycoides

2.6.1. Anzuchtbedingungen

2.6.1.1. Submerskulturen

Submerskulturen wurden im 500 ml Erlenmeyerkolben oder im Reagenzglas ausgeführt.
Bei der Zellanzucht im Erlenmeyerkolben wurden 100 ml Medium mit 0,5 ml logarithmisch wachsender Kultur beimpft. Lyophilisierte Zellen wurden mit wenig steriler Saline in die Anzuchtkolben gespült und in der logarithmischen Phase überimpft. Bei der Anzucht im Reagenzglas wurden 10 ml Medium mit 0,1 ml logarithmischer Mycoplasmenkultur beimpft. Inkubiert wurde bei 37°C für 24 bis 48 h in Standkulturen.
Das Wachstum wurde über die Messung der OD bei 578 nm verfolgt.

2.6.1.2. Gewinnung von Klonen

Aus logarithmisch waschsenden Submerskulturen wurden Verdünnungsausstriche auf Platten gemacht.
Nach 2 bis 3 Tagen bei 30°C waren gegen das Licht winzige Pünktchen sichtbar, die unter dem Binokular die typische Spiegeleiform von Mycoplasmenkolonien hatten. Unter dem Binokular wurden mehrere Einzelkolonien mit einer angespitzten Platinnadel abgeimpft und im Reagenzglas mit sterilem Medium suspendiert.

In der Regel nach 3 bis 5 Tagen zeigte eine leichte Trübung erneutes Wachstum an.
Diese Submerskultur wurde erneut auf der Platte ausgestrichen und davon Einzelkolonien abgeimpft.
Nach dreifacher Wiederholung wurde angenommen, daß die Kulturen einheitlich waren.

2.6.1.3. Adaptieren eines Stammes an cholesterinverarmtes Medium

Aus einer logarithmisch wachsenden Kultur mit 10 µg/ml Cholesterin im Medium wurden 0,1 ml auf 10 ml Medium mit einem Cholesteringehalt von 5 µg/ml überimpft. Die Zellen konnten sich in fünf Passagen an diese Bedingungen adaptieren; jeweils aus der logarithmischen Phase wurde mit 0,1 ml überimpft. Danach wurde in einem Medium mit 3,7 µg/ml Cholesterin inkubiert. Nach fünf Passagen wurde der Cholesteringehalt auf 2,5 µg/ml gesenkt und die Kultur während weiterer fünf Passagen daran adaptiert. Es folgten fünf Kulturen mit 1,25 µg/ml Cholesterin und 5 mit 0,6 µg/ml, bevor kein Cholesterin mehr zugesetzt wurde. Die Stämme wuchsen nach ihrer Adaptierung mit den annähernd gleichen Generationszeiten wie die Wildtypstämme im Vollmedium. Zur Rückadaptierung genügte die Oberimpfung auf Normalmedium.

2.6.1.4. Aufbewahrung der Zellen

100 ml logarithmisch wachsender Kultur (Wildtyp oder an Cholesterinmangel adaptierte Stämme) wurden mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 1,5 mol/l versetzt.
1 ml-Portionen der Kultur wurden steril in Reagenzgläser pipettiert verschlossen und in einem Gemisch aus Trockeneis und Alkohol möglichst schnell eingefroren. Gelagert wurden die eingefrorenen Kulturen bei -70°C.

Der Einfriervorgang brachte zwar eine merkliche Verringerung an lebenden Zellen, aber die Zahl an lebenden Zellen war in allen Kulturen etwa gleich und verringerte sich auch kaum merkbar innerhalb eines Jahres (Standardinokulum).

2.6.2. Versuche zur Adaptierung an HGL und Diplopterol

2.6.2.1. Wachstum unter stufenweisem Cholesterinentzug bei gleichem HGL-Angebot

Von einer mit 10 µg/ml Cholesterin logarithmisch wachsenden Kultur wurden 0,1 ml auf ein Medium mit 5 µg/ml Cholesterin und 10 µg/ml HGL überimpft.
HGL wurde als ethanolische Lösung (6,1 mg HGL / 600 µl Ethanol) zugesetzt. Der Cholesteringehalt der Medien wurde, wie unter 2.6.1.3. beschrieben, sukzessive abgesetzt, während in allen Cholesterinmangelstufen der Gehalt an HGL 10 µg/ml betrug.

2.6.2.2. Biophotometerversuche

2.6.2.2.1. Anzuchtbedingungen

Die Wachstumsexperimente wurden in einem Rundbiophotometer (Firma Bonet Maury et Jouan, Paris) durchgeführt.
Kultiviert wurde in 10 ml modifiziertem Edward-Medium (EDWARD, FITZGERALD, 1951; RAZIN, ROTTEM, 1976), in dem die PPLO-Serumfraktion durch 5 mg/ml fettsäurefreies Serumalbumin (Fraktion V), 5 µg/ml Palmitinsäure und 5 µg/ml Elaidinsäure ersetzt war. Die unterschiedlichen Mengen an Sterolen oder Hopanoiden, den Versuchen im Ergebnisteil direkt zu entnehmen, wurden als ethanolische Lösung oder als DPPC-Liposomen zugesetzt.
Angeimpft wurde mit 0,1 ml Standardinokulum (Wildtyp oder adaptierte Zellen). Inkubiert wurde bei 37°C, unter mikroaerophilen Bedingungen und leichter Flüssigkeitsbewegung für 2 bis 4 Tage. Die optische Dichte (OD) wurde bei Weißlicht in Zweiminutenintervallen gemessen.
Das eingesetzte HGL wurde nach der als verkürztes Verfahren beschriebenen Methode isoliert; verwendetes Diplopterol war die von Dr. Vértesy gereinigte Substanz.

2.6.2.2.2. Liposomenpräparation

In einem Teil der Versuche wurden Cholesterin und Hopanoide nach einer modifizierten Technik nach KAHANE, RAZIN (1977) in Liposomen angeboten.

Zur Liposomenpräparation wurden Stammlösungen von Cholesterin, DPPC in Chloroform, HGL und Diplopterol in Chloroform/Methanol (2:1 v/v), über Einwaage aus Festsubstanz hergestellt. Die DPPC-Stammlösung enthielt noch 4 mol% an DPPA, zur Verbesserung der Stabilität der Liposomen.
Um klare HGL- und Diplopterollösungen zu erhalten, wurden die bei Raumtemperatur sich bildenden Dispersionen leicht erwärmt. Die Cholesterinmenge für eine Endkonzentration von 3,3 µg/ml im Mycoplasmenmedium wurde zusammen mit einer equimolaren Menge an DPPC-Lösung vereinigt. Das Chloroform/Methanol Lösungsmittelgemisch wurde mit Stickstoff abgeblasen und der sich bildende Lipidfilm in 3 ml Medium resuspendiert.
Die Dispersion wurde 30 s bei 45°C auf dem Vortexmixer geschüttelt und anschließend vier mal eine Minute beschallt (Branson Sonifier B-12, Branson Sonic Company, Denbury, Connecticut; Microtip, Stufe 4). Um an der Glaswand zerstäubte Dispersion aufzunehmen, wurde nochmals kurz auf dem Vortex geschüttelt und abschließend die Liposomendispersion nach Sterilfiltration dem Medium zugesetzt.

2.6.2.3. Plattendiffusionstest[1)]

In sterile Plastikschalen wurden 25 ml festes Medium eingegossen. Die verwendeten Medien enthielten 10 µg/ml Cholesterin oder 10 µg/ml HGL.
Den Platten wurden Filterrondelle (Durchmesser 6 mm) mit 10 µg/Rondell Herbicolin aufgelegt.
Inkubiert wurde bei 37° C für 2 bis 3 Tage.

2.7. Die "Differential Scanning Calorimetry" (DSC)

Die thermisch induzierte Phasenumwandlung wurde mit dem Privalov-Kalorimeter (PRIVALOV et al., 1975), einem adiabatischen Differentialkalorimeter, ausgeführt.

---

1) Die Versuche wurden dankenswerterweise von Frau Gerlinde Reichle durchgeführt.

Die hohe Empfindlichkeit des Geräts erlaubt die Messung der Umwandlung in stark verdünnten Lösungen, so daß Lipidkonzentrationseffekte keine Rolle spielen. Durch das geringe Probenvolumen von 1 ml ist das Gerät darüber hinaus noch sehr substanzsparend.

2.7.1. Meßprinzip (BLUME, 1976)

Zur Bestimmung der Umwandlungsenthalpie mißt man die Wärmekapazität des Systems in Abhängigkeit von der Temperatur.
Man arbeitet dabei nach dem Differentialprinzip, d.h. die Wärmekapazität der Probe wird mit der eines Referenzsystems verglichen. Die zur Temperaturänderung benötigte Wärme wird als elektrische Energie zugeführt. Die Wärmekapazität ist wie folgt definiert:

$$c = P \frac{dt}{dT} \qquad c = \text{Wärmekapazität}$$

P ist die pro Zeitintervall dt zugeführte elektrische Leistung, die zu einer Temperaturerhöhung dT führt.
Bei der 'Differential Scanning Calorimetry (DSC)', bei der Probe und Referenzsystem gleich schnell aufgeheizt werden, sind zusätzliche energetische Prozesse in der Meßprobe durch vermehrt oder vermindert zugeführte elektrische Leistung sichtbar. In diesem Fall gilt für die Differenz der Wärmekapazitäten:

$$c_{Diff} = c_{Probe} - c_{Referenz} = (P_{Probe} - P_{Referenz}) \frac{dt}{dT} = P_{Diff} \frac{dt}{dT}$$

P_{Diff} und c_{Diff} sind die durch die gelöste Substanz bedingte Zusatzheizleistung bzw. Zusatzwärmekapazität. Ist die Wärmekapazität von Probe und Referenz gleich, ist c_{Diff} gleich Null.
Nur im Temperaturintervall von Strukturumwandlungen von T_A (Anfang) bis T_E (Ende), bzw. im Zeitintervall von t_a und t_e wird c_{Diff} ungleich Null.
Die Umwandlungsenthalpie Δh_{cal} ergibt sich durch Integration von c_{Diff}:

$$\Delta h_{cal} = \int_{T_A}^{T_E} c_{Diff}\, dT = \int_{t_a}^{t_e} P_{Diff}\, dt$$

Zur Bestimmung der [illegible] wird demnach die [illegible] kapazität [illegible] als Funktion der Temperatur [illegible] gistriert und im Intervall T_1 bis T_2 [illegible] angegeben.

2.7.2. Aufbau eines adiabatischen [illegible] [illegible]

Abb. 1 zeigt das Blockdiagramm eines [illegible].

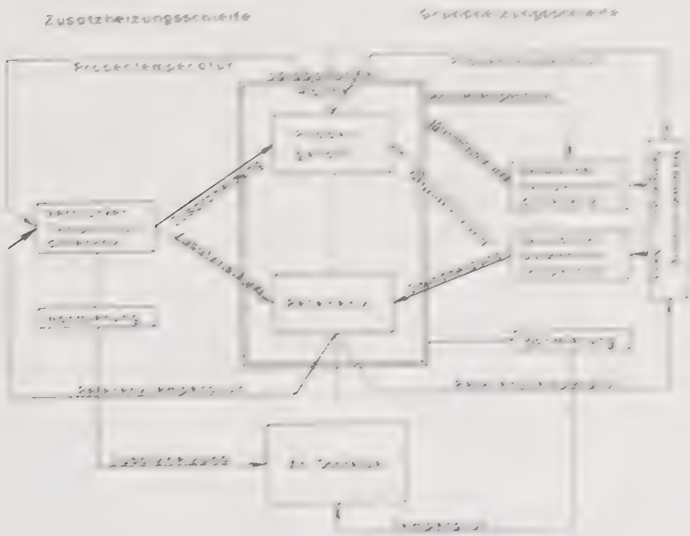


Abb. 1: [illegible]
[illegible]

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung des [illegible]. Die beiden [illegible] haben ein Volumen von etwa 1 ml. An die Rundzylinder aus Gold sind [illegible] aus Platin ange-setzt. Zwischen den beiden [illegible] befindet sich eine [illegible]

thermosäule - mit sehr hoher Zahl an Gefäßverbindungen -, die die beiden Gefäßheizungen so steuert, daß die Probengefäße sich immer auf gleicher Temperatur befinden. Differentialthermosäulen zwischen den Probengefäßen und den beiden adiabatischen Silbermänteln regeln die Mantelheizungen so, daß sich das Gesamtsystem auf einer Temperatur befindet. Ein Platinwiderstandthermometer mit einer Genauigkeit von $0{,}1^{0}C$ nimmt die Temperatur an einem äußeren Mantel ab und gibt sie auf den X-Kanal eines X-Y Schreibers (Philips PM 8131). Der äußere Silbermantel ist in einen wärmeresistenten Hartschaumstoff eingepaßt, der von einem abschließenden Aluminiumblock getragen wird.

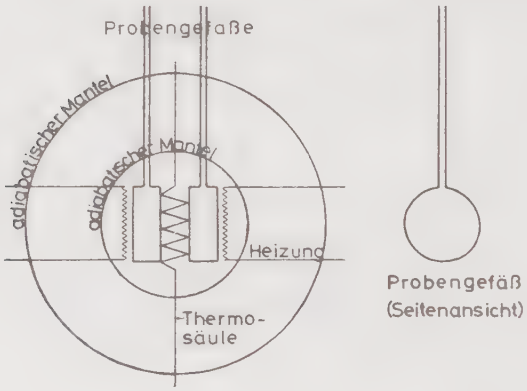


Abb. 2: Schematische Darstellung des Privalov-Kalorimeters (verändert nach MABREY, STURTEVANT, 1978)

Im Bereich einer endothermen Strukturumwandlung führt die auftretende Zusatzwärmekapazität zu einer verlangsamten Aufheizgeschwindigkeit des Probengefäßes relativ zum Referenzgefäß. Die entstehende Temperaturdifferenz wird von der Thermosäule aufgenommen, verstärkt, und durch eine erhöhte Heizleistung auf das Probengefäß wieder ausgeglichen. Diese Zusatzheizleistung wird in Abhängigkeit von der Zeit (Temperatur) registriert. Die Diagramme der Zusatzheizleistung bzw. Zusatzwärmekapazität

als Funktion der Zeit bzw. Temperatur, Kalorigramme genannt, werden zur Bestimmung der Umwandlungsenthalpie integriert.

2.7.3. Herstellen der Lipiddispersion zur Messung im Differentialkalorimeter (modifiziert nach BLUME, 1980)

Aus den zu untersuchenden Phospholipiden wurde mit Chloroform als Lösungsmittel Stammlösung hergestellt. THBH wurde in Chloroform/Methanol (9:1 v/v) gelöst. Die Gewichtsanteile von DPPC und THBH wurden mit einer Microanalysenwaage (Firma Sartorius, Schweiz; Genauigkeit 1 µg) durch Differenzwägung bestimmt. Die Konzentrationen der beiden verzweigten PCs, DIHPC und DAHPC wurden über anorganisches Phosphat bestimmt (siehe unten).

Die zur Herstellung der Liposemendispersion nötigen Lipidanteile wurden aus den Stammlösungen mit einer Agla-Mikrometerspritze (Genauigkeit 0,2 µl) in 5 ml Schnappdeckelgläser vereinigt. Die Menge an Phospholipid wurde so gewählt, daß sie in der späteren Liposomendispersion zwischen 0,2 und 1,5 mg/ml Puffer lag. Die organischen Lösungsmittel wurden bei etwa 50°C mit Stickstoff abgeblasen. Um dem vorzeitigen Auskristallisieren der Lipidanteile aufgrund der verschiedenen Löslichkeiten vorzubeugen, wurde diese erhöhte Temperatur gewählt. Zur Entfernung von Restlösungsmitteln wurden die Lipidfilme noch zwei Stunden im Vakuum getrocknet. Die so getrockneten Lipidfilme wurden mit 2 ml bidestilliertem Wasser versetzt und bei 50°C (oberhalb des Phasenübergangs) 2 min am Vortexmixer geschüttelt. War keine homogene Dispersion entstanden, wurde die Prozedur wiederholt. Bei niedrigen THBH-Konzentrationen war es nötig, die Lipiddispersion in einem Branson Ultraschallbald für etwa 1 min bei Raumtemperatur zu beschallen. Höhere Konzentrationen an THBH wurden nach der Vortextbehandlung für 1 min mit dem Ultraschalldesintegrator (100 Watt Ultrasonic Disintegrator, MSE, London) oberhalb des Phasenübergangs beschallt. Der verwandte Schwingstab aus Titan hatte einen Durchmesser von 9,5 mm. Die eingestellte Energiestufe betrug 5 (Schwingungsamplitude des Schwingstabes: $5 \cdot 10^{-4}$ cm). Optisch lagen nach dieser Behandlung homogene Lipiddispersionen vor.

Die Proben wurden vor der Messung für mindestens 30 min bis mehrere Stunden bei ca. 5°C temperiert. Eventuell entstandene Liposomensedimentationen wurden durch kurzes Schütteln vor der Messung wieder in homogenen Zustand versetzt.

2.7.4. Kalorimetrische Messungen am Privalov-Kalorimeter

Die wie eben beschrieben hergestellte Liposomendispersion wurde mittels einer Glasspritze mit langer Stahlkanüle luftblasenfrei in das Probengefäß des Privalov-Kalorimeters eingefüllt. Als Referenz diente bidestilliertes Wasser. Die beiden Gefäße wurden durch die Gerätekühlung auf 0,5°C gebracht und anschließend wurde mit ansteigender Temperatur und den Geschwindigkeiten von 2°C/min und 1°C/min gemessen.
Mindestens zwei Messungen (bei völliger Reproduzierbarkeit), meist jedoch drei und mehr Messungen wurden von jeder Dispersion durchgeführt. Besonders bei DHPC ergab sich eine Abhängigkeit der Vorumwandlung von der Vorkühlzeit, so daß eine große Zahl an Messungen nötig war, um Reproduzierbarkeit zu erreichen.

2.7.5. Auswertung der Kalorigramme

Geeicht wurden die Kalorimeterkurven durch Vergleich mit einem elektrischen Signal mit bekannter Leistung (50 µW). Die Kalorimeterkurven wurden zur Auswertung mit einem Hewlett-Packard-Plotter (Modell 9872A), der mit einem Rechner verbunden war (Hewlett-Packard 9845A), digitalisiert. Die normalerweise stabile Basislinie wurde den Kurven zugefügt und mit Hilfe eines nach der numerischen Integration arbeitenden Computerprogrammes die Kurvenflächen bestimmt.
Die molare Übergangsenthalpie (ΔH_{cal}) errechnet sich dann aus der gemessenen Übergangsenthalpie, unter Berücksichtigung des Phosphatgehaltes (siehe unten) und des Eichsignals.

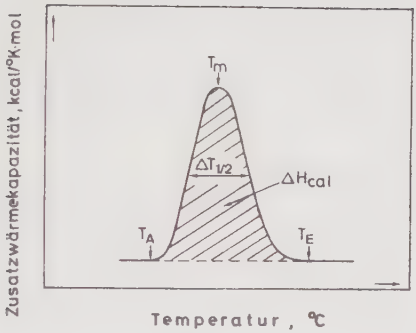


Abb. 3: Schematische Darstellung einer digitalisierten Kalorimeterkurve, für einen endothermen Zwei-Stadien-Prozeß

2.7.6. Berechnung der Übergangsentropie ΔS und der $\Delta H_{van't\text{-}Hoff}$-Reaktionsenthalpie

Da bei der Mittelpunktstemperatur des Phasenübergangs die "freie Energie" (ΔG) des Systems gleich Null ist, kann der Entropiebetrag, der mit der Phasenumwandlung verbunden ist, errechnet werden nach:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m}$$

ΔS wird oft in cal/°K·mol angegeben.
Die $\Delta H_{v.H.}$-Werte werden aus der genannten Zusatzwärmekapazität im Bereich der Umwandlung kalkulierbar.

Trägt man den Umwandlungsgrad θ[1)] gegen T auf, so kann man aus der Steigung der Kurve für $\theta = 1/2$ die van't Hoffsche Reaktionsenthalpie für einen Gleichgewichtsprozeß errechnen (ENGEL, SCHWARZ, 1970):

Ein Phasenübergang läßt sich durch die einfache Annahme eines Übergangs von Zustand A nach B beschreiben

$$A \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} B \qquad (1)$$

Dafür ist die Gleichgewichtskonstante K definiert als

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{c_B}{c_A} \qquad (2)$$

Aus der Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstante von der Temperatur kann man die mit diesem Prozeß verknüpfte Enthalpieänderung, die van't Hoffsche Reaktionsenthalpie, errechnen.

$$\left(\frac{d \ln K}{dT}\right)_p = \frac{\Delta H_{v.H.}}{RT^2} \qquad (3)$$

Setzt man für K in Gleichung (2)

$$K = \frac{\theta}{1-\theta} \qquad (4)$$

in den Ausdruck (3), so erhält man:

$$\left(\frac{d \ln \frac{\theta}{1-\theta}}{dT}\right)_p = \frac{\Delta H_{v.H.}}{RT^2} \qquad (5)$$

---

1) Der Umwandlungsgrad θ ist als das Verhältnis zwischen der Zahl umgewandelter Zustände zur Gesamtzahl der Zustände ($\theta = \frac{\text{Zahl umgewandelter Zustände}}{\text{Gesamtzahl der Zustände}}$) definiert.
θ schwankt zwischen Null und Eins und nimmt in der Regel im Phasenübergang T_m den Wert von $\theta = 1/2$ an.

Daraus ergibt sich die Abhängigkeit des Umwandlungsgrades θ von T zu:

$$\left(\frac{d\theta}{dT}\right)_p = \theta\,(1-\theta)\,\frac{\Delta H_{v.H.}}{RT^2} \qquad (6)$$

An der Umwandlungstemperatur T_m, für den θ den Wert $\theta = \frac{1}{2}$ hat, gilt für $\Delta H_{v.H.}$:

$$\left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{p,\ \theta = \frac{1}{2}} = \frac{1}{4}\,\frac{\Delta H_{v.H.}}{RT_m^2} \qquad (7)$$

$$\Delta H_{v.H.} = 4\,RT_m^2 \left(\frac{d\theta}{dT}\right)_{p,\ \theta = \frac{1}{2}} \qquad (8)$$

$$\Delta H_{v.H.} \simeq 4\,R\,\frac{T_m^2}{\Delta T_{1/2}} \qquad (9)$$

Der Vergleich der so errechneten $\Delta H_{v.H.}$- Werte mit den tatsächlich gemessenen Umwandlungsenthalpien erlaubt Aussagen über die Kooperativität des Systems, d.h. über die Anzahl der kooperativ miteinander wechselwirkenden Moleküle. Sie ergibt sich aus dem Verhältnis der van't Hoffschen Reaktionsenthalpie ($\Delta H_{v.H.}$) zur kalorimetrisch gemessenen Umwandlungsenthalpie (ΔH_{cal}):

$$CU = \frac{\Delta H_{v.H.}}{\Delta H_{cal}} \qquad CU = \text{"Cooperative Units"} \qquad (10)$$

Die so definierte Einheit CU ist ein Maß für die intermolekulare Kooperativität der Phospholipide. Sie wird in einer Zahl kooperierender Moleküle angegeben und sollte für einen total kooperativen Vorgang 1. Ordnung und reiner Substanz unendlich sein, während sie für einen unkooperativen Vorgang gleich eins ist. Die Kooperativität läßt sich auch aus der Schärfe der Umwandlung beurteilen, die sinnvoll oft als das Temperaturintervall ($\Delta T_{1/2}$) bei halber Höhe oder als gesamter Temperaturbereich ($\Delta T = T_E - T_A$) der Umwandlung angegeben wird. Die $\Delta T_{1/2}$ - Werte reichen von <0,1°C für sehr reine synthetische Lipide bis 10-15°C für biologische Membranen.

2.7.7. Phosphatanalyse (VOGEL, 1961)

1 mM KH_2PO_4 (Standardphosphatlösung)
15 %ige Na_2SO_3
12,5 g $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ in 500 ml 10 N H_2SO_4
150 mg Hydrazinsulfat in 100 ml H_2O ($H_2NNH_2 \times H_2SO_4$)
70 %ige Perchlorsäure

Die zwischen 0,01 und 0,1 mg Phosphat enthaltenden Proben wurden mit Einwegspritzen bei Differenzwägung oder mit der Agla-Micrometerspritze bei Bestimmung über Volumen in gebogene Reagenzgläser gefüllt. Das bei der Bestimmung über Volumen vorhandene Lösungsmittel wurde durch Erhitzen ausgetrieben. Der wässrigen Suspension oder dem Lipidfilm wurden 0,3 ml Perchlorsäure zugesetzt und die Reagenzgläser 30 min bei 200°C in einem Aluminiumblock erhitzt. Die organischen Bestandteile wurden dabei abgebaut. Nach dem Abkühlen der Probe wurden 0,8 ml Natriumsulfitlösung zur Reduzierung überschüssiger Perchlorsäure zugesetzt und kurz erwärmt (5 min bei 100°C). Nach Zugabe von 1 ml Molybdatlösung, 0,4 ml Hydrazinsulfatlösung und 10 ml Wasser wurden die Proben durch Schütteln gemischt und 10 min im siedenden Wasserbad gekocht. Anschließend wurden die Proben im Eisbad auf Zimmertemperatur abgekühlt.
Die Extinktionen der blaugefärbten Lösungen durch sechs- und vierwertige Mischoxide des Molybdäns wurden in 3 cm Küvetten bei 600 nm im Spektralphotometer (Modell SP 1800, Firma Pye Unicam) gemessen.

Mit der Standardphosphatlösung wurde eine Eichgerade erstellt, deren Geradengleichung durch lineare Regression ermittelt wurde.

2.8. Monolayer-Methode

Die Lipidbestandteile natürlicher Membranen orientieren sich als monomolekularer Film in der Luft-Wasser-Grenzschicht (DAVENPORT, 1971). Die amphipathische Natur der Lipide zwingt dabei die Moleküle zu einer Orientierung nach hydrophiler und hydrophober Interaktion. Die polaren Molekülteile der Lipide sind in der Luft-Wasser-Grenzschicht in das Wasser orientiert und hydratisiert, während der hydrophobe Teil in die Luft weist.

2.8.1. Das Meßprinzip

Nach GIBBS (1948) ist die Zusammensetzung der Interphase eine Funktion des chemischen Potentials der Komponenten und der sich mit ihr im Gleichgewicht befindlichen Subphase. Danach ist

$$-d\gamma = \Sigma\, \Gamma_i\, d\mu_i \qquad (1)$$

wobei γ die Oberflächenspannung ist, Γ_i die Konzentrationsdifferenz, verglichen mit der Subphase ($\Gamma_i = C_{\text{Oberfläche}} - C_{\text{Subphase}}$), der Komponente i, und μ_i ist ihr chemisches Potential. Für den Fall der extremen Unlöslichkeit einer Substanz, wie etwa bei Lipiden, entspricht Γ_i der Gesamtkonzentration der in der Interphase aufgebrachten Moleküle.
Ebenfalls nach GIBBS (1948) errechnet sich der Oberflächendruck π (Filmdruck) nach

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \qquad (2)$$

mit γ_0 als Oberflächenspannung der reinen Subphase und γ der Spannung mit oberflächenaktiven Substanzen. Aus (1) und (2) folgt, daß die Änderung des Filmdrucks ($d\pi$) direkt von der Konzentration der in der Interphase befindlichen Substanzen abhängt.

$$d\gamma = \Sigma\, \Gamma_i \mu_i \qquad (3)$$

2.8.2. Die Monolayerfilmwaage

GAINES (1966) beschreibt ausführlich die für die Messung notwendige Technik der Filmkompression und die Messung des Oberflächenfilmdrucks nach der Methode von LANGMUIR-ADAM und WILHELMI (LANGMUIR, 1917).

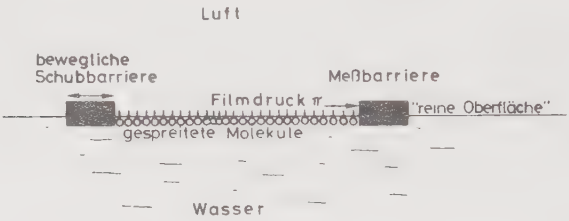


Abb. 4: Schematische Darstellung der Monolayerfilmwaage nach LANGMUIR (1917).

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, beruht das Meßprinzip auf einer Messung des Filmdrucks π (Differenz der Oberflächenspannungen zwischen reiner Oberfläche und Oberfläche mit gespreiteten Molekülen) als Funktion der den Molekülen zur Verfügung stehenden Fläche. Diese Grenzschichtmessungen am Monolayer erlauben die direkte Bestimmung des Flächenbedarfs pro Molekül und dessen Änderung als Funktion des Filmdrucks und der Temperatur.

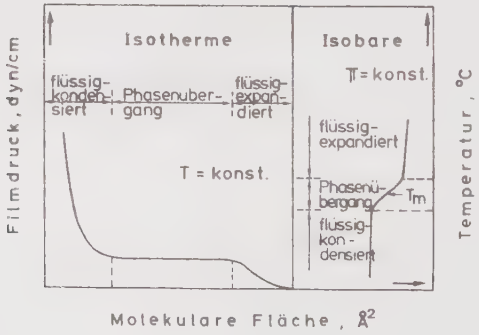


Abb. 5: Schematische Darstellung von Isotherme und Isobare eines Lipids mit einem Phasenübergang

Die bei konstanter Temperatur erhaltenen Filmdruck/Fläche-Diagramme, die Isothermen (Abb. 5), ähneln in vieler Hinsicht den Druck/Volumen-Diagrammen realer Gase. Außerdem wurden bei konstantem Druck die Temperatur/Flächen-Diagramme gemessen. Aus diesen Isobaren ist als Mittelpunkt des Phasenübergangs eine Phasenübergangstemperatur T_m bestimmbar. Isotherme und Isobare sind für die verwendeten Substanzen charakteristisch.
Die Messungen wurden mit einer kommerziellen Filmwaage (Firma Dr. Wobser, Lauda) mit kontinuierlichem Meßsystem ausgeführt.

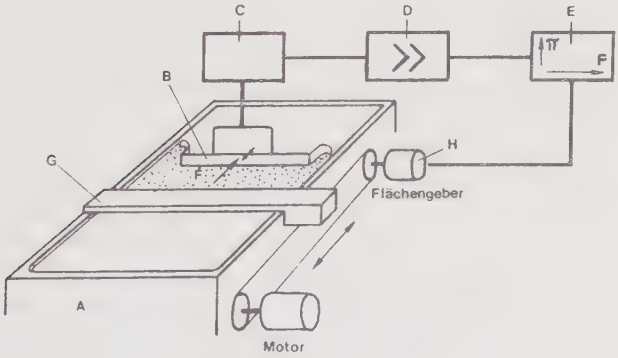


Abb. 6: Das Meßprinzip der Lauda-Filmwaage

Die zur Aufnahme des Filmes notwendige Trägerflüssigkeit (Subphase) befindet sich in einem teflonisierten, temperierbaren Metalltrog (A). Die Meßbarriere (B) trennt die filmbedeckte von der reinen Oberfläche. Die gespreiteten Moleküle befinden sich auf der durch die Meßbarriere (B) und die Schubbarriere (G) begrenzten Flächen (F). Die Schubbarriere wird durch einen Motor angetrieben und verändert das Flächenangebot des Films. Ein Flächengeberpotentiometer, das simultan mit der Schubbarriere bewegt wird, wandelt die den Molekülen angebotene Fläche (F) in eine proportionale Gleichspannung um, die auf den X-Kanal des X/Y-Schreibers gegeben wird. Die Differenz der Oberflächenspannungen ($\Delta\gamma$) wird mit einem elektronischen Kraftmeßsystem (C) gemessen, verstärkt (D) und nach entsprechender Eichung als Filmdruck π auf den Y-Kanal eines X/Y-Schreibers (E) gegeben.

2.8.3. Die Meßbedingungen an der Filmwaage

Die Meßbedingungen wurden analog den von BLUME (1979) publizierten Angaben durchgeführt.
Das gesamte Gerät war thermostatisiert mit einer Genauigkeit von ±0,5°C (Gerät K2R, Meßgerätewerk Dr. Wobser). Um die Flüssigkeitsverluste, speziell über 25°C, zu minimieren, wurde der Gerätedeckel mitbeheizt.
Während der Messungen wurden die Filme mit ultrareinem Stickstoff begast.
Die Meßbarriere war mit einer zusätzlichen Heizung ausgestattet, um die Nullpunktsdrift bei Isobaren möglichst klein zu halten (kleiner 2 dyn/cm zwischen 5°C und 50°C).
Die Temperatur wurde durch ein Digitalthermometer mit einer Diode als sensitives Element (M. Grubert, Phys. Chem. Inst. der Univ. Freiburg) bestimmt.
Durch analoge Ausgänge wurden Temperatur, Filmdruck und Fläche/Molekül auf die X- bzw. Y-Achse eines X/Y-Schreibers (Philips PM 8131, Hewlett-Packard 2FAM, Metrawatt Servogor XY Typ RE 551) übertragen.
Als Subphase wurde bidestilliertes Wasser aus einer Quarzanlage benutzt. Spuren von Oberflächenverunreinigung wurden vorab entfernt, indem die Barriere bis an den Schwimmer herangeführt und die angezeigte Verunreinigung abgesaugt wurde. Alle Messungen wurden mit frischen Monolayerfilmen ausgeführt. Die Isothermen wurden mit einem Barrierevorschub von 3 $Å^2$ / Molekül pro min gepreßt. Die Messungen begannen 2 bis 5 min nach Auftrag des Lipidfilmes und dauerten zwischen 10 und 15 min.
Die Isobarenmessungen erfolgten nach einer Temperierungszeit von 45 bis 60 min.Sie wurden mit ansteigender Temperatur (2°C/min) durchgeführt. In der Regel wurde bei einem Filmdruck von 25 dyn/cm (Ausnahmen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen) gemessen; die automatische Druckreglulierung hielt den Filmdruck auf ±2 dyn/cm konstant.
Die einzelnen Kurven waren innerhalb der Meßgenauigkeit reproduzierbar.

2.8.4. Herstellen der Lipidfilme

Mit den verwendeten Phospholipiden wurden Stammlösungen in Dichlormethan und Chloroform hergestellt. Ebenfalls in Dichlormethan (Chloroform) wurde Cholesterin gelöst. Für THBH und Diplopterol wurden Dichlormethan (oder Chloroform)/Methanol (9:1 v/v) benutzt, während HGL in den gleichen

Lösungsmitteln, aber mit 20% (v/v) Methanol gelöst wurde.
Alle Lösungsmittel wurden dreifach vor dem Gebrauch destilliert und auf ihre Verwendbarkeit in der Monolayerwaage getestet.
Die Konzentrationsbestimmungen der Lipidlösungen erfolgte für Hopanderivate und Cholesterin über Einwaage auf der Microanalysenwaage (Firma Sartorius). Die Konzentration von Phospholipiden wurde von den frischen Stammlösungen nach der im Kalorimeterteil beschriebenen Methode bestimmt (VOGEL, 1961). Auf die mit diesen Werten gemessenen reproduzierbaren Filmflächen wurden ältere Stammlösungen in regelmäßigen Abständen normiert.
Die für die Einzelmessung benötigte Lipidkonzentration wurde mit einer Agla-Mikrometerspritze (Genauigkeit 0,2 µl) in kleinen Lösungsmitteltropfen auf die Subphase aufgebracht. Lipidgemische wurden unmittelbar vor der Messung in einem 3 ml Gefäß mit Teflonstopfen hergestellt und aufgebracht. Die Lösungsmittelverluste waren gering, da die Monolayer aus verschiedenen Mischversuchen gut reproduzierbar waren.
Die Lipidlösungen wurden zur Minimierung der Lösungsmittelverluste bei -20°C aufbewahrt.

2.9. Methode zur Messung relativer Permeabilitäten

Das Konzept multilamellarer Phospholipidstrukturen, Liposomen (Abb. 7) als Modell für biologische Membranen stammt von Bangham und seinen Mitarbeitern (BANGHAM, 1963; BANGHAM et al., 1965a, b; 1967a,b).

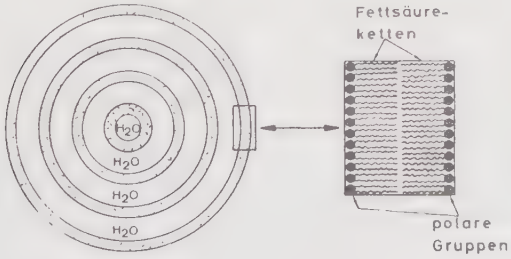


Abb. 7: Schematische Darstellung der multilamellaren Struktur von Liposomen

Das Modell beruht auf dem Faktum, daß Phospholipide biologischen Ursprungs in der Gegenwart von Wasser oder wässrigen Lösungen (und normalerweise oberhalb ihres Phasenüberganges T_m) eine Reihe von Reorganisationen in ihrer flüssig-kristallinen Struktur (smektische Mesophase) erfahren.
Die Liposomenbildung beginnt mit einem Eindringen von Wasser und gelöster Substanz in die Zwischenräume der Phosopholipid-Kopfgruppen und bewirkt eine schnelle Umorganisation der Lipidmoleküle.
In Gegenwart einer genügend großen wässrigen Phase bilden sich danach konzentrische Lagen von "Bilayer-Membranen", die jeweils durch eine wässrige Phase getrennt werden (Abb. 7).
Da sich diese Strukturen im thermodynamischen Gleichgewicht befinden, d.h. im Minimum der 'freien Energie' der Oberflächenkräfte, werden weder Bruchstellen in den Lipidflächen noch Grenzflächen aus hydrophoben Ketten und Wasser gebildet.
Daraus folgt, daß jedes wässrige Kompartiment durch eine geschlossene Membran von dem Nachbarkompartiment getrennt ist und damit ein definiertes Volumen hat.
Ebenso folgt daraus, daß das in einer Kaskade von Kompartimenten eingeschlossene Wasser und die gelösten Substanzen durch Diffusion nur innerhalb der Kompartimente beweglich sind und erst nach Transfer durch die trennende Lipidmembran das Nachbarsystem oder die äußere Phase erreichen (nach BANGHAM, 1968).

2.9.1. Meßprinzip (BANGHAM et al., 1967a,b)

Für eine definierte Liposomenkonzentration besteht für die Lichtstreuung (Extinktion E) mit dem reziproken Wert der Wellenlänge ein experimenteller Zusammenhang.
Bei einer Wellenlänge mit mittlerer Empfindlichkeit (λ = 450 nm) wies Bangham für die Extinktionen $E_{450\ nm} < 0{,}6$ eine annähernd lineare Abhängigkeit von Extinktion und Lipidkonzentration nach. Werden Liposomen in einer Salzlösung definierter Konzentration präpariert, schwellen bzw. schrumpfen sie in hypo- bzw. hypertonischer Lösung des gleichen Salzes. BANGHAM et al.(1967b)konnten zeigen, daß das Schwellen (Schrumpfen) von durch die Membran permeierendem Wasser verursacht wird, wobei die treibende Kraft osmotischer und nicht elektrostatischer Natur ist.

Schwellen und Schrumpfen von Liposomen läßt sich gut mit der Lichtstreuung der Suspension verfolgen. Nach BANGHAM et al. (1967b) ist der experimentelle Zusammenhang zwischen Liposmenvolumen (V) und der Extinktion (E)

$$\frac{1}{E} \sim V \quad (E \sim \frac{1}{V})$$

Wie an natürlichen und synthetischen PC-Dispersionen gezeigt wurde, gibt es einen linearen Zusammenhang zwischen dem Volumen ($\frac{1}{E}$) von Liposomen und den Osmolaritäten von Liposomeninhalt und der umgebenden Lösung (BANGHAM, 1968; RENDI, 1967; DE GIER et al., 1968). Diese Beziehung ist im Einklang mit dem von Boyle und van't Hoff gefundenen Gesetz für ideale Osmometer. Der Befund, daß Liposomen sich wie ideale Osmometer verhalten, eröffnet die Möglichkeit, die Permeabilität von eindiffundierenden Molekülen zu messen, indem Liposomen in einem nicht oder beinahe nicht permeablen Agens (z.B. K^+) präpariert werden und anschließend in der isotonischen Lösung eines permeierenden Stoffes die aufgrund osmotischer Kräfte stattfindende Schwellung gemessen wird. Unter der Annahme, daß die Liposomen sich wie ideale Osmometer verhalten und daß Wasser wesentlich schneller durch die Membranbarrieren diffundiert als die zu untersuchenden Substanzen (Glycol, Glycerin, Erythrit), ist die anfängliche Schwellrate (idealisiert bei t = 0) in isotonischer Lösung proportional der Permeabilitätskonstanten (P_s) des gelösten Stoffes und der äußeren Oberfläche des Osmometers (JACOBS et al.,1950). Daraus folgt, daß

$$\left(\frac{d \frac{1}{E}}{dt} \right)_{t = 0} \cdot P_s$$

wobei $\left(\frac{d \frac{1}{E}}{dt} \right)_{t = 0}$ die anfängliche Schwellrate ist und P_s die Permeabilität für die gemessene Substanz. Da keine absoluten Permeabilitäten gemessen wurden, wurde als Maß für die relative Permeabilität (P_{rel}) der Quotient aus dem Reziproken der Extinktion ($\frac{1}{E_I}$) in isotonischer Lösung des nichtpermeierenden Salzes und der anfänglichen Schwellrate in isotonischer Lösung der zu messenden Substanz definiert:

$$P_{rel} := \frac{\left(\frac{d \frac{1}{E}}{dt} \right)_{t = 0}}{\frac{1}{E_I}} \cdot 100$$

Die relativen Permeabilitäten (P_{rel}) werden demnach als anfängliche Änderung des Liposomenvolumens in Prozent der Extinktion der Liposomendispersion zum Zeitpunkt t = 0 - $P_{rel}\left(\frac{d\frac{1}{E}\ \%}{dt}\right)$ - angegeben (verändert nach DE GIER et al., 1968).

2.9.2. Apparatur zur Messung schneller Änderungen der Lichtstreuung

Zur Messung der relativen Permeabilität (P_{rel}) war eine Meßeinrichtung mit geringer Mischzeit nötig.
Zu diesem Zweck wurde ein Photometer mit diskreten Wellenlängen (Typ 1101 M, Firma Eppendorf) umgebaut.

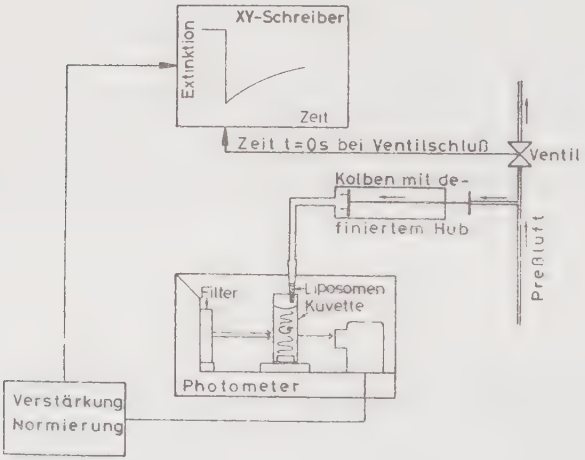


Abb. 8: Schematische Darstellung der Meßanordnung

2.9.2.1. Schematischer Aufbau

Wie Abb. 8 zu entnehmen ist, wurde in den Küvettenhalter eines Eppendorf-Photometers eine schnelldrehende Rührvorrichtung eingebaut.
In die mit hoher Drehzahl laminar bewegte Pufferlösung wurde mit Preßluft die Liposomendispersion eingespritzt.
Auf einem X/Y-Schreiber (Servogor XY Typ RE 551, Metra Watt GmbH) wurde die Transmission in Abhängigkeit von der Zeit geschrieben. Nullpunkt der Zeitachse war der Zeitpunkt, bei dem durch kurzzeitiges Verschließen eines Preßluftventils der sich bildende Druckstau die Liposomendispersion in die Pufferlösung einschoß.

2.9.2.2. Rührvorrichtung

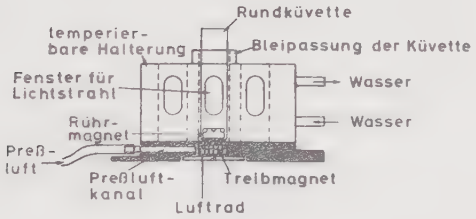


Abb. 9: Schematische Darstellung des Küvettenhalters

In den Fuß einer Küvettenhalterung wurde ein Luftrad aus Teflon mit asymmetrischen Zähnen eingepaßt. Durch eine seitlich gegen den Zahnradmittelpunkt verschobene Kanüle wurde Preßluft mit einem Druck von 0,4 atm gegen die an dieser Stelle senkrecht stehenden Zähne gedrückt. In das Rad eingelassen war ein kleiner Stabmagnet. Ein den ganzen Fuß in seiner Schmalseite durchsetzender Tunnel sorgte für den staufreien Abzug der Preßluft. Um eine völlig homogene Flüssigkeitsphase zu erhalten und für

eine gleichmäßige Durchmischung mit der Liposomenfraktion war es notwendig, eine Rundküvette in das Meßsystem zu plazieren. Sie wurde aus kommerziellen Laborglasstäben mit einem Außendurchmesser von 11,5 mm und einer Innenweite von 10,8 mm gearbeitet. Die Höhe betrug 51,7 mm. Für den stabilen Sitz dieser Küvetten wurde in die Halterung eine Bleifassung eingegossen, in die die Küvetten durch angebrachte Marken reproduzierbar eingesetzt werden konnte.
Gerührt wurde der Küvetteninhalt mit einem teflonisierten Rundmagneten (Durchmesser 9,3 mm, Höhe 5,6 mm) mit vier kreuzförmig angeordneten Kerben von 2,6 mm Tiefe. Die erreichten Mischzeiten lagen bei 1 s und weniger.

2.9.2.3. Mischvorgang mit Liposomen

Wie aus Abb. 8 und Abb. 10 ersichtlich, befand sich die Liposomendispersion in einer Plastikspitze (Eppendorfspitzen, gelb) dicht oberhalb des Flüssigkeitskonus. Der Ausfluß der Dispersion war seitlich zur Wand hin versetzt und mit 5^{o} gegen die Küvettenwand geneigt. Unter diesen Bedingungen wurde eine fast turbulenzenfreie Durchmischung erreicht.

Die Luftsäule oberhalb der Dispersion war über ein Handventil mit der Außenluft verbunden, so daß sich während der Temperierphase kein Überdruck bilden konnte.
Gestartet wurde die Messung durch plötzlichen hohen Luftdruck über der Liposomendispersion, der sie im Millisekundenbereich in den Puffer einspritzte. Erreicht wurde dies durch zwei mit den Stempeln gekoppelten Druckluftzylindern (je 10 cm^3 Gesamtvolumen), wobei über eine kurzzeitig geschlossene Druckluftleitung in einem Zylinder ein Betriebsdruck aufgebaut wurde, der, über die gekoppelten Stempel vermittelt, ein Luftvolumen von 1 cm^3 gegen die Lipiddispersion preßte. Die Stempelstellung des Druckstempels wurde so gewählt, daß der Kolben auf den Zylinderboden als Arretierung schlug; damit konnten reproduzierbare Einspritzdrücke erreicht werden.
Nach der Messung wurde der Temperiermantel angehoben und die Plastikspitze mit einer Pinzette abgehogen.
Für die folgende Messung wurde in eine frische Plastikspitze die benötigte Dispersionsmenge einpipettiert und auf den Führungskonus aufgesetzt.

Mit Hilfe der Abschlußkappe und der Küvettenkappe wurden die Plastikspitzen in ihrer Lage fixiert, während der ganze Temperiermantel durch zwei Zapfen, die Mantelführungen, in den Küvettenhalterungen der Nachbarküvetten befestigt war.
Durch die sternförmig zueinanderstehenden Justierschrauben war es möglich, den Einspritzwinkel und -ort so zu wählen, daß minimale Turbulenzen auftraten.

2.9.2.4. Temperierung der Meßvorrichtung

Die umgebaute Küvettenhalterung war eine kommerziell vertriebene, wassertemperierbare Eppendorf-Halterung. Die in Abb. 10 dargestellte Einspritzvorrichtung für die Liposomendispersion war eine gleichfalls wassertemperierbare Eigenkonstruktion.
Die Einspritzhalterung (Abb. 10) ist von einem Temperiermantel umgeben, dessen Wasserzuführung in Reihe mit der Küvettenhalterung geschaltet war.

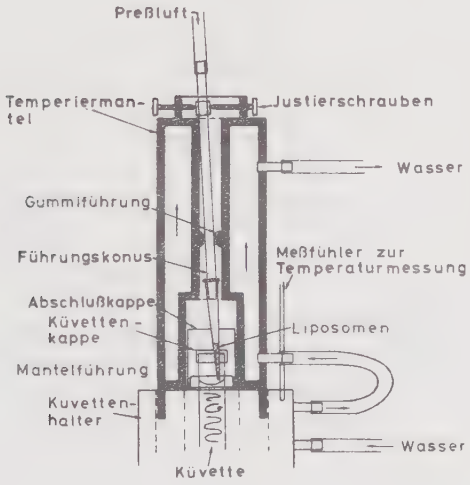


Abb.10: Schematischer Aufbau des Temperiermantels

Der Manteiinnenraum war so dimensioniert, daß die Küvettenhalterung sie vollkommen nach unten abschloß. Nach oben wird dieser Küvettenraum durch die Gummiführung abgeschlossen. Über der Liposomendispersion befand sich eine 10 cm hohe temperierte Luftsäule, von der angenommen wurde, daß die Temperatur direkt über der Dispersion der Meßtemperatur entsprach.
Über ein in den Küvettenraum eingebautes Kupfer-Konstantan-Thermometer konnten keine Temperaturschwankungen nachgewiesen werden.
Für niedrige und hohe Meßtemperaturen (0^{o} - 10^{o} und 50^{o} - 60^{o}) lagen die Temperierzeiten von nicht vortemperierten Proben bei 7 min. Für nur gegeringe Abweichungen von der Raumtemperatur lagen die Temperierzeiten bei 2 bis 3 min. Ein in den Küvettenblock eingelassenes Diodenthermometer (MGS III-162, Shibaura Electronics Co, LTD, Japan) war in guter Übereinstimmung mit dem Widerstandsthermometer und mit einem Quecksilberthermometer, so daß es für die Temperaturkontrolle benutzt wurde.
Zur Thermostatisierung wurden Geräte von Braun (Thermomix 1420, Braun Melsungen) und Dr. Wobser KG (MGW Lauda Typ K2R, Dr. Wobser KG/Lauda) eingesetzt.

2.9.2.5. Optisches System

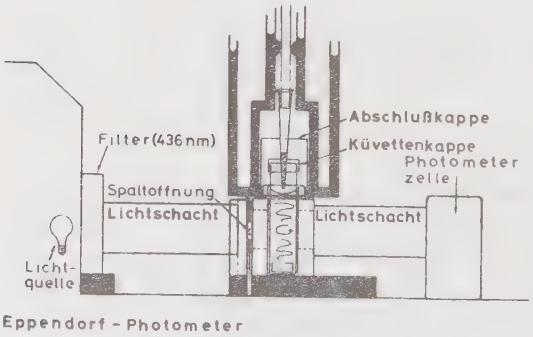


Abb. 11: Schematischer Aufbau der Meßvorrichtung am Eppendorf-Photometer

Um ein rauscharmes Signal von der Photozelle zu erhalten, mußte der gesamte Lichtweg gegen Streulicht abgeschirmt werden.

Die offenen Lichtwege zwischen Wellenlängenfilter und Küvette sowie Küvette und Photozelle wurden mit schwarzen Hohlzylindern überbrückt. Der Flüssigkeitskonus der Pufferlösung wurde durch eine schwarze Küvettenkappe und durch eine auf der Küvettenhalterung sitzende Abschlußkappe mit schwarzer Innenlackierung gegen Streulicht abgeschirmt. Zur Lackierung wurde ein schwarzer Mattlack verwendet.
Als "optisches Fenster" wurde der zur Standardausrüstung des Geräts gehörende schmale Schlitz (2,5 x 1,2) gewählt.
Maximale Signalintensität konnte nur bei senkrechter Orientierung des Wellenzuges zur Küvettenoberfläche erreicht werden. Der geräteeigene Küvettentransport wurde daher durch eine Festarretierung ersetzt. Gemessen wurde mit einem Filter für 436 nm.

2.9.2.6. Messung des Schwellverhaltens

Schwellexperimente wurden in KCl (50 mM) und in isotonischen Lösungen von Glycol, Glycerin, Erythrit und Glucose (alle 100 mM) durchgeführt.

Gemessen wurde im Temperaturbereich zwischen 10^{o} und 70^{o}. Die verwendeten Puffer wurden unter Wasserstrahlpumpenvakuum und leichtem Rühren auf dem Magnetrührer entgast, bis keine Blasen mehr aufstiegen - zur Erzielung einer rauscharmen Grundlinie unbedingt notwendig - .
Anschließend wurden sie auf die gewünschten Temperaturen im Wasserbad vorgewärmt.
2,5 ml des so vorbehandelten Puffers wurden in die Rundküvette pipettiert und 5 min ohne Rühren und mit aufgesetztem Temperiermantel in der Küvettenhalterung auf die Meßtemperatur gebracht. 30 µl der im Kühlschrank aufbewahrten Liposomendispersion (in allen Versuchen mit 50 mM KCl präpariert) wurden in die Einspritzspitze pipettiert und auf den Führungskonus in dem kurz abgehobenen Temperiermantel aufgesetzt.
Mit dem durch die Mantelführung justierten Temperiermantel wurde die Einspritzspitze durch die Abschluß- und Küvettenkappe in den Küvettenraum eingeführt und in ihrer Lage fixiert.
Für weitere drei Minuten wurde Liposomenpräparat und Meßvorrichtung temperiert.
Bei laufendem Preßluftmotor wurde die Photometer- und Schreibereinrichtung kontrolliert, bevor nach Verschluß des Handventils die Messung gestartet wurde.

Ein denkbarer Abfall der Meßtemperatur durch den eingeschalteten Preßluftmotor konnte nicht gemessen werden.

2.9.2.7 Das Meßsignal

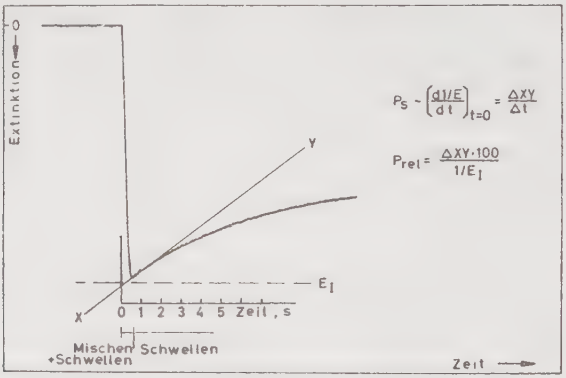


Abb. 12: Schematische Darstellung des Meßsignals schwellender Liposomen in isotonischer Lösung einer permeablen Substanz, die z.B. in KCl präpariert wurden. E_I ist die Extinktion des Liposomenpräparats in isotonischer, nichtpermeierender Salzlösung

Wie schon ausgeführt, ist die Änderung der Schwellung in der Anfangsphase des Experiments ein Maß für die Permeabilität der gelösten Substanz.

In isotonischen Lösungen des gleichen Salzes tritt keine Volumenänderung der Liposomen auf (Gerade E_I in Abb. 12; Verhalten in 50 mM KCl Puffer).

In Gegenwart andersartiger, permeierender Substanzen im Puffer beginnen die Liposomen zu schwellen.

Die anfängliche Schwellung $\left(\frac{d\frac{1}{E}}{dt}\right)_{t=0}$ ist ein Maß für die Permeabilität der Substanz bei den gegebenen Bedingungen. Bestimmbar wird $\left(\frac{d\frac{1}{E}}{dt}\right)_{t=0}$, indem man, nach abgeschlossener Mischphase, eine Tangente (XY) an die Schwellkurve anlegt und ihre Steigung bestimmt.
Wie in Abb. 12 ersichtlich, beginnt die Liposomenschwellung bereits während der Mischphase. Zum Zeitpunkt t = 0 sollten ohne Mischeffekte in isotonischen Lösungen, gleichgültig welcher Substanz, die Extinktionen gleich sein. In solchen Systemen schneidet die Tangente an die Schwellkurve im Zeitpunkt t = 0 den Extinktionswert E_I, d.h. die Extinktion in nicht schwellaktivem isotonischem Puffer.
Hat die Tangente zum Zeitpunkt t = 0 einen Wert, der kleiner ist als E_I, kann daraus geschlossen werden, daß die Mischphase zu lange dauerte und nicht mehr die Anfangspermeabilität gemessen wurde. Messungen, die solches Verhalten zeigten, wurden verworfen.
Als ausreichend genaues Kriterium für die Anfangspermeabilität wurde der Schnittpunkt von E_I mit der Tangente XY innerhalb der ersten Sekunde erachtet.

2.9.3. Liposomenpräparation

Lösungen mit definierten Konzentrationen an Ei-PC bzw. Ei-PA in Chloroform/Methanol (3:2 v/v) bzw. Cloroform wurden verwendet.
1,2 Di-ω-cyclohexyldodecanoyl-phosphatidylcholin (DCDPC) und die abgeleitete Phosphatidsäure (DCDPA) waren in Chloroform/Methanol (3:2 v/v) und reinem Chloroform gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der Lipide erfolgte über Differenzwägung der trockenen Lipide. Zur Gewichtsbestimmung wurden die Lipide im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.
Cholesterin war in Chloroform, Diplopterol und Hopanglycolipid in Chloroform/Methanol (2:1 v/v) gelöst. Die Diplopterol- und Hopanglycolipiddispersionen gingen bei leichter Erwärmung sofort in Lösung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls über Differenzwägung unter den oben benannten Bedingungen. Zur Präparation wurden die gelösten Lipide in den gewünschten Konzentrationen in ein vorgereinigtes 10 ml Schnappdeckelglas pipettiert.
Die Endkonzentration betrug 15 µmol Lipid pro ml Puffer. Die verwendeten PCs enthielten 4 mol% PA der gleichen Fettsäurezusammensetzung, zur

Vergrößerung der Liposomenkompartimente und damit der Schwelleffekte. Das leitungswasserwarme organische Lösungsmittel wurde mit Stickstoff bis zur Bildung trockener Lipidfilme abgeblasen. Zur Entfernung des Restlösungsmittels wurden die Filme ein bis zwei Stunden im Hochvakuum getrocknet.

Zu den so getrockneten Lipidfilmen wurde eine Glasperle (⌀ 2,0 mm) und eine entsprechende Volumeneinheit (in der Regel 1 ml) 50 mM KCl gegeben.

Die Gläschen wurden im Wasserbad auf etwa 50° erwärmt (oberhalb des Phasenübergangs T_m) und auf dem Vortex-Rührer für 30 s bei höchster Frequenz geschüttelt.

Die Proben wurden erneut für 1 min temperiert und 30 s geschüttelt. Danach lagen die reinen Lipide und die Lipid/Cholesterin-Systeme optisch und unter dem Mikroskop als homogene Dispersion vor.

In den Diplopterol/Lipid-Dispersionen, verstärkt aber in den HGL/Lipid-Liposomen traten für höhere Konzentrationen ($\geq$ 20 mol%) zunehmende Anteile an Kristallen, wahrscheinlich aus reinem Diplopterol bzw. HGL auf.

Durch veränderte Präparationsmethoden wurde versucht, diese Kristallisation aufzuheben; aber sowohl verstärkte Beschallung im Branson-Ultraschallbad und Branson-Ultrasonifier als auch eine Gefriertrocknung aus Benzol brachten keine verbesserten Ergebnisse.

Erst ein Verfahren, das die fraktionierte Kristallisation dieser schlecht löslichen Lipide beim Entfernen des organischen Lösungsmittels unterbindet, könnte das Problem beheben. Da das Problem nicht behoben werden konnte, wurde mit den teilweise auskristallisierten Lipiden gearbeitet. Schienen die Ergebnisse einen Vergleich mit den weitgehend homogenen Proben auch nach Diskussion nicht zu rechtfertigen, wurden sie weggelassen.

Die fertigen Präparate wurden bei ca. 5°C im Kühlschrank aufbewahrt. Gemessen wurde an den Liposomen,solange keine bemerkbare Abnahme der Extinktion der Dispersion auftrat. Da die Liposomen bei längeren Meßpausen sedimentierten, wurde nach jeder längeren Pause kurz mit dem Vortexrührer geschüttelt und vor der Einzelmessung die Präparate mit der Hand geschüttelt.

2.9.4. Präparation von PA aus PC (verändert nach EIBL, KOVATCHEV, 1981)

Puffer: 0,2 M Natriumacetat
0,08 M Calciumchloride
mit Essigsäure auf pH 5,6 einstellen
0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8,5

14 mg PC wurden in ein 10 ml Schraubglas mit Teflondichtung eingewogen und in 250 µl Butanol gelöst. Nacheinander wurden 3,25 ml Äther, 2,25 ml Puffer, 1 ml Phospholipase D-Lösung (5 mg Enzym pro ml Wasser) und 3,25 ml Wasser pipettiert.
Das Reaktionsgefäß wurde gut verschlossen und bei Raumtemperatur für 12 Stunden leicht gerührt.

Am Rotationsverdampfer wurde der Äther entfernt und mit 1,3 ml EDTA-Puffer die vorhandenen Ca^{2+}-Ionen komplexiert. Extrahiert wurde mit 6,5 ml Chloroform und 7,8 ml Methanol.
Die Chloroformphase wurde abgetrennt und das Reaktionsgemisch erneut mit 3,25 ml Chloroform versetzt und ausgeschüttelt.
Die vereinigten Chloroformextrakte wurden filtiert und bis zur Trockne am Rotationsverdampfer eingeengt.
Der Niederschlag wurde in 650 µl Chloroform aufgenommen und mit 2,6 ml Aceton erneut gefällt. Er wurde in einer Nutsche abgetrennt, die Lösungsmittel gesammelt, verdampft und der Rückstand in 130 µl Chloroform gelöst und mit 520 µl Aceton gefällt. Der entstandene Niederschlag aus PA wurde mit der Hauptmenge auf der Nutsche vereinigt und das Filtrat noch einmal wie eben beschrieben behandelt.
Die vereinigten Niederschläge wurden mit 3 x 5 ml Aceton gewaschen und mit 1 ml Chloroform gelöst und abgesaugt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde noch mit 3 x 1 ml Chloroform ausgewaschen. Die Chloroformphase wurde mit Stickstoff abgeblasen und im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug nach dieser Prozedur ca. 90% der theoretischen Ausbeute.

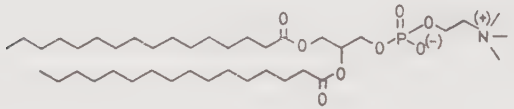
Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt mit dem von EIBL, KOVATCHEV (1981) vorgeschlagenen Laufmittelsystem zur Trennung nach Kopfgruppeneigenschaften:Chloroform/Methanol/Ammoniak (25%ig) (65:30:3 v/v). In diesem Laufmittelsystem wurden die PAs über den R_f-Wert (R_f = 0) mit Vergleichssubstanz identifiziert.
Die Identifizierung erfolgte mit Molybdatoschwefelsäure (SKIPSKI, BARCLAY, 1969). Das Reaktionsprodukt war einheitlich und verunreinigungsfrei.

3. ERGEBNISSE

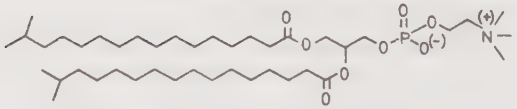
3.1. Charakterisierung der verwendeten Lipide

3.1.1. Phospholipide

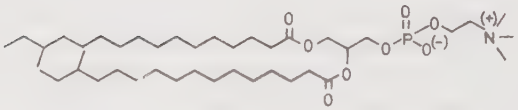
In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich PCs, u.U. mit geringen Anteilen von PA, benutzt.



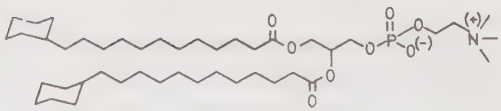
DPPC ($C_{40}H_{81}O_8NP$; MG = 734,1)



DIHPC ($C_{42}H_{85}O_8NP$; MG = 762,1)



DAHPC ($C_{42}H_{85}O_8NP$, MG = 762,1)



DCDPC ($C_{44}H_{85}O_8NP$; MG = 786,1)

Abb. 13: Strukturformeln der verwendeten synthetischen Lipide

Wie LANGWORTHY et al. (1976) gezeigt haben, enthält die Cytoplasmamembran von Bacillus acidocaldarius kein PC. Trotzdem wurde diese Kopfgruppenspezies wegen ihrer guten Quelleigenschaften in Wasser, der leichten Ausbildung von Vesikeln und Liposomen (SACKMANN, 1978 und 1982) und der Ähnlichkeit mit dem in der B.a.-Membran vorkommenden PG gewählt (MCELHANEY, 1982).

Tab. 1 listet für die maximal gestreckten Fettsäureketten die Moleküldimensionen auf.

Lipid	Acylketten-C-Zahl	Acylkettenlänge	Projektion auf d. Membrannormale	Kettendurchmesser	Zitate
		Å	Å	Å	
DMPC	14:0	21,1 (E)		4,2 x 3,8	E = ENDO et al. (1982)
	15:0	22,4 (B)		4,2 x 3,8	B = Berechnet; die Ausgangswerte wurden ENDO et al(1982) entnommen
DPPC	16:0	23,7 (E)		4,2 x 3,8	
DSPC	18:0	26,2 (B)		4,2 x 3,8	
DOPC	16:1	23,3	20,6	4,3 x 7,9	alle nichtgekennzeichneten Werte wurden direkt an Kalotten gemessen
	18:1	25,8	22,7	4,3 x 9,5	
	18:2		22,4	5,0 x 8,6	
	20:2		23,7	5,0 x 10,8	
DIHPC	17:0 i	23,7		4,7 x 5,0	
DAHPC	17:0 ai	23,7		4,7 x 5,0	
DCUPC	17:0ω-cyc	21,6 (E)		5,2 x 6,5	
DCDPC	18:0ω-cyc	22,9 (B)22,2		5,2 x 6,5	
DCTPC	14:0ω-cyc	24,2 (E)		5,2 x 6,5	

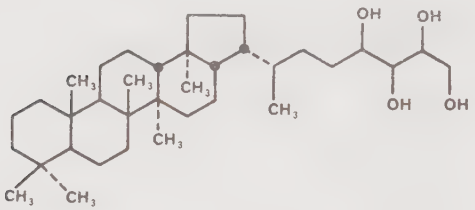
Tab. 1: Kettendimensionen der gestreckten Fettsäuremoleküle

Die polare Kopfgruppe ist mit dem P-N Dipol in wässrigen Suspensionen parallel zur Interphase orientiert (HAUSER et al., 1981; SEELIG et al., 1977; BÖLDT et al., 1978) und hat eine Dicke von ca. 10 Å (HAUSER et al. 1981).

3.1.2. Hopanoide

3.1.2.1. Tetrahydroxybacteriohopan

Nach LANGWORTHY, MABERRY (1976) und FÖRSTER et al. (1973) handelt es sich um 1,2,3,4-Tetrahydroxypentan-29-hopan mit folgender Struktur:



Tetrahydroxybacteriohopan (THBH)

THBH war auf der DC-Platte Schiff-positiv und Ninhydrin-negativ und lief mit einem R_f-Wert von 0,37 (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 60:10:1 v/v; Kieselgel 60, unaktiviert).
Im GC war der Acetatester einheitlich und verunreinigungsfrei. Das Massenspektrogramm[1)] zeigte alle von FÖRSTER et al. (1973) und von LANGWORTHY, MAYBERRY (1976) angegebenen m/e-Werte.
Aufgrund dieser Charakteristika konnte THBH als saubere und als die bei LANGWORTHY und FÖRSTER beschriebene Substanz identifiziert werden.

THBH ($C_{35}H_{62}O_4$, MG 546) bildete bei Gefriertrocknung aus Benzol weißliche, amorphe Flocken von geringem spezifischem Gewicht. Bei nicht vollständiger Entfernung von Lösungsmitteln bildete sich ein transparenter Lipidfilm.

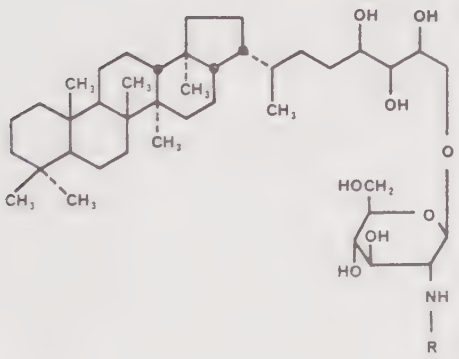
---

1) Die massenspektrographischen Untersuchungen wurden von Herrn Spitzner, Universität Stuttgart-Hohenheim, durchgeführt.

Bei Lagerung unter Stickstoff und -25°C ist THBH einige Zeit einheitlich haltbar, bevor verschiedene Spaltprodukte auftreten. Löslich ist THBH in organischen Lösungsmitteln mittlerer Polarität (Chloroform, Methylenchlorid, Aceton, Äther). Sowohl in unpolaren (Benzol, CCl_4, Toluol usw.) als auch in stark polaren Lösungsmitteln (Alkohol, Wasser) ist THBH nicht löslich.

3.1.2.2. Hopanglycolipid

LANGWORTHY et al. (1976) beschrieben für die Verbindung 1-(O-β-N-acyl-glucosaminyl)-2,3,4-tetrahydroxypentan-29-hopan folgende Struktur:



Hopanglycolipid (HGL)

Dünnschichtchromatographisch war die isolierte Substanz sauber und lief mit einem R_f-Wert von 0,26 (Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 60:10:1 v/v; Kieselgel 60, unaktiviert). Die DC-Flecken waren Schiff-positiv und Ninhydrin-negativ.

Nach saurer Hydrolyse verschwanden die HGL-Banden und freies THBH und seine Spaltprodukte traten auf.
Massenspektren[1] nach der Felddesorptionsmethode und die oben genannten Eigenschaften erlaubten die Identifizierung der isolierten Substanz als das von LANGWORTHY et al. (1976) beschriebene HGL. Die Heterogenität von HGL wurde ebenfalls in den MS-Messungen bestätigt.

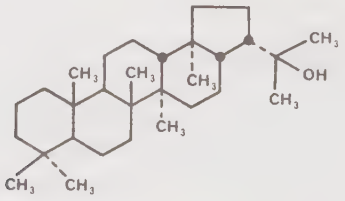
HGL ist in getrocknetem Zustand ein amorphes, weißes Pulver. Bei Lagerung im Tiefkühlfach (-25°C) war die Substanz stabil. Wie am R_f-Wert ersichtlich, ist HGL stärker polar als THBH. Dies äußerte sich in der schlechteren Löslichkeit von HGL auch in polaren organischen Lösungsmitteln. Um einigermaßen befriedigende Löslichkeiten zu erreichen, wurden deshalb polaren organischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform) 20 bis 50% Methanol zugesetzt.
LANGWORTHY et al. (1976) bestimmten das Fettsäuremuster der Acylketten an Glucosamin zu:

$C_{17:0}$	br	- Fs	33,4%
$C_{17:0}$	ω-cyc	- Fs	42,4%
$C_{19:0}$	ω-cyc	- FS	19,0%

Daraus errechnete sich für HGL ein mittleres Molekulargewicht von MG = 944.

3.1.2.3. Diplopterol

Die Struktur von 22-Hydroxy-29-hopan wurde von OURISSON et al. (1979) wie nachfolgend angegeben:



22-Hydroxy-29-hopan (Diplopterol)

1) Die Massenspektren wurden von Herrn PD Dr. Zeller, Organisch Chemisches Institut Universität Tübingen, ausgeführt

Die Identifizierung von Eigenisolaten erfolgte dünnschichtchromatographisch gegen Vergleichssubstanzen.
Der R_f-Wert der isolierten Substanz lag bei R_f = 0,29 (Laufmittel Dichlormethan; Kieselgel 60, unaktiviert) und war vergleichbar groß wie die R_f-Werte der Eichsubstanzen.
In getrocknetem Zustand ist Diplopterol ($C_{30}H_{52}O$, MG 428) ein weißes, amorphes Pulver.
Bei -25°C im Gefrierfach war es ohne Veränderung lagerbar. Löslich ist Diplopterol in polaren organischen Lösungsmitteln, unlöslich bis wenig löslich ist es in stark unpolaren, sowie in stark polaren Lösungsmitteln.

Bei Diplopterol aus Methylobacterium organophilum handelt es sich um ein Methyl-Diplopterol,das die zusätzliche Methylgruppe am C 6 oder C 7 des Hopangerüstes trägt (ROHMER, persönliche Mitteilung).

3.1.2.4. Größenvergleich der untersuchten Triterpenoide mit Cholesterin

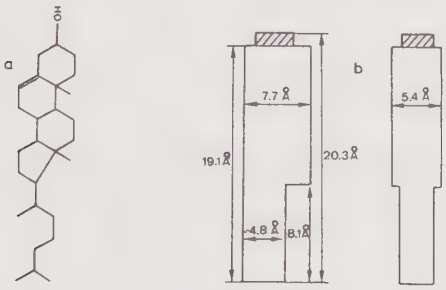


Abb. 14: Cholesterin: a) Strukturformel b) schematische Seitenansichten. Verändert nach OURISSON, ROHMER (1982) und Kalottenmessungen

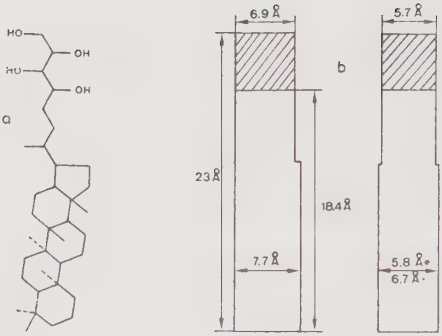


Abb. 15: Tetrahydroxybacteriohopan: a) Strukturformel; b) schematische Seitenansichten; *nach OURISSON, ROHMER (1982); •eigene Messung

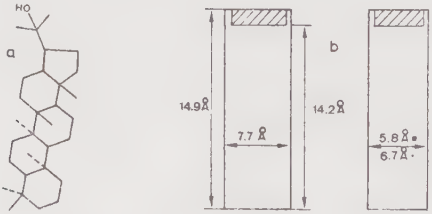


Abb. 16: Diplopterol: a) Strukturformel; b) schematische Seitenansichten; *nach OURISSON, ROHMER (1982), •eigene Messung

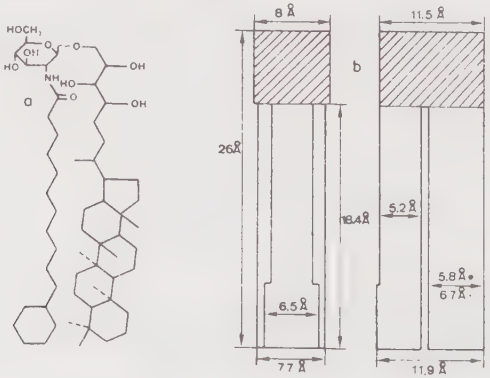


Abb. 17: Hopanglycolipid: a) Strukturformel; b) schematische Seitenansichten; *Werte nach OURISSON, ROHMER (1982); •eigene Werte

Einschränkend muß für die genannten Moleküldimensionen gesagt werden, daß am Kalottenmodell die plausibelsten Molekülorientierungen gewählt wurden.

3.2. Kalorimetrische Messungen

Die kalorimetrischen Messungen an den untersuchten Lipidsystemen liefern die thermodynamischen Parameter Umwandlungstemperatur, -enthalpie, -entropie und die Kooperativität einer Phasenumwandlung. Diese Parameter erlauben eine Abschätzung der molekularen Wechselwirkungen und deren Abhängigkeit von der Struktur der untersuchten Moleküle.

3.2.1. Kalorimeterkurven reiner Lipide

Es wurden PCs untersucht, die, dem Fettsäuremuster von B.a. entsprechend, als Acylketten Iso-, Anteiso- und ω-Cyclohexanfettsäuren trugen. Deren Längen waren gleich oder angenähert gleich der von Palmitinsäure. Daraus ergibt sich eine Vergleichbarkeit von DPPC mit den untersuchten DIHPC, DAHPC und DCDPC.

Abb. 18 zeigt die DSC-Umwandlungskurve von DIHPC. Die thermodynamischen Daten sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

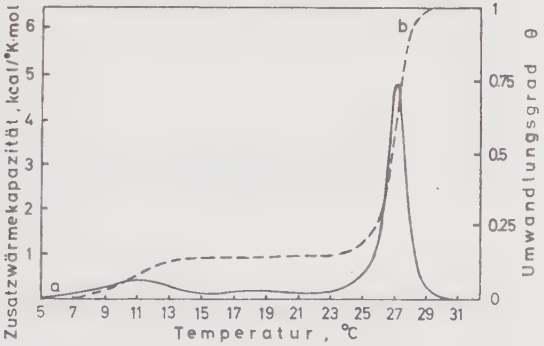


Abb. 18: a) DSC-Kalorigramm des thermotropen Phasenübergangs einer DIHPC-Dispersion in Wasser; b) Normierte Umwandlungskurve des Phasenübergangs vom gleichen Lipid; Lipidkonzetration: 0,301 µmol/ml; Heizrate: 2°C/min.

Lipid	Gesamtprozeß					Vorumwandlung		Hauptumwandlung				
	T	ΔH_{Ges}	ΔS	$\Delta H_{v.H.}$	CU	T_p	ΔH_p	T_m	ΔH_m	ΔS_m	$\Delta H_{v.H.}$	CU
	°C	kcal/mol	cal/°K.mol	kcal/mol		°C	kcal/mol	°C	kcal/mol	cal/°K.mol.	kcal/mol	
DPPC *		10,6				35,3	1,8	41,4	8,7	27,8	2272,5	260
DIHPC		9,4		291	31	11,4	1,3	27,2	8,1	27,0	238	29,5
DAHPC	6,6	4,0	14,2	172	43	5,2	1,4	7,1	2,6	9,3		
DCDPC	13,8	6,8	~23,8	102	15	13,3	4,0	15,2	3,0	10,4		

* nach MABREY, STURTEVANT, 1978

Tab. 2: Kalorimetrisch ermittelte Daten des Phasenübergangs wässriger Dispersionen von PCs mit gleicher Acylkettenlänge

DIHPC zeigt in der hier abgebildeten Kurve eine energiereiche Hauptumwandlung (Phasenübergangstemperatur T_m = 27,2°C) und eine energieärmeren Vorumwandlung (Übergangstemperatur T_p = 11,4°C).
Lage und Größe der Vorumwandlung waren bei wiederholten Messungen signifikant von der Vorkühlzeit der Probe abhängig.

In Abb. 19 ist die DSC-Umwandlungskurve und der Umwandlungsgrad in Abhängigkeit von der Temperatur von DAHPC dargestellt. Die kalorimetrischen Daten sind ebenfalls in Tab. 2 aufgelistet.

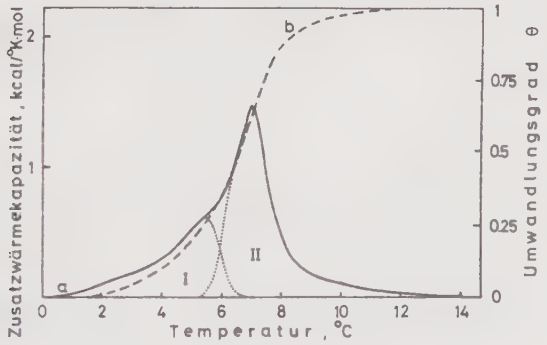


Abb. 19: a) DSC-Kalorigramm einer DAHPC-Dispersion in Wasser;
b) Normierte Umwandlungskurve des Phasenübergangs von DAHPC;
Lipidkonzentration: 0,43 µmol/ml; Heizrate: 2°C/min.

DAHPC zeigt im Temperaturintervall von 1,5°C bis 13,3°C einen breiten Phasenübergang, der sich aus zwei langgestreckten, flachen Flanken, einer linksseitigen Schulter bei etwa 5°C und einem Maximum bei 7,3°C zusammensetzt.
Zu den von MCELHANEY gemessenen Werten (KANNENBERG et al., 1983) ergeben sich in dieser Bestimmung relativ große Diskrepanzen. So errechnete er aus seinen Kalorimeterkurven eine Übergangsenthalpie von 6,3 ± 0,4 kcal/mol. Der Kurvenverlauf zeigt zudem eine stark veränderte Topologie mit einem ausgeprägt breiten zweiten Maximum bei 5,2°C.

Allerdings scheint die Schulter in dem von mir gemessenen Kalorigramm auch einen zweiten Peak anzudeuten. Für die in Abb. 19 willkürlich eingefügten Bereiche I und II werden in der folgenden Aufstellung die thermodynamischen Daten mit denen aus KANNENBERG et al. (1983) verglichen.

	eigene Werte	MCELHANEY (KANNENBERG et al. 1983)
T_p (^oC)	5,2	5,2
ΔH_p (kcal/mol)	3,5	1,4
T_m (^oC)	7,1	8,3
ΔH_m (kcal/mol)	2,6	2,86
ΔS_m (cal/^{o}K.mol)	9,3	10,3

Deutlich wird, daß die von mir als Hauptumwandlung (Bereich II) bezeichnete Umwandlung gut mit den Enthalpie- und Entropiewerten von MCELHANEY übereinstimmt, während die großen Diskrepanzen im Bereich der Vorumwandlung zu suchen sind (Bereiche I).

Die thermotrope Umwandlungskurve und der Umwandlungsgrad θ von DCDPC ist in Abb. 20 zu sehen. Die thermodynamischen Daten faßt Tab. 2 zusammen. Die Bereiche I und II in Abb. 20 wurden willkürlich in die Kurve gelegt.

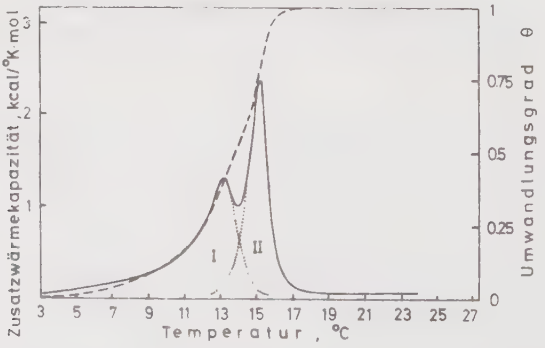


Abb. 20: a) DSC-Umwandlungskurve in einer DCDPC-Dispersion in Wasser
b) Normierter Umwandlungsgrad θ von DCDPC; Lipidkonzentration: 2,0 µmol/ml; Heizrate. 2°C/min.

Die Umwandlungskurve für den Gesamtprozeß zeigt im Temperaturintervall von 3,8°C bis 18°C eine breite Umwandlung mit zwei Maxima bei T_p = 13,3°C und T_m = 15,2°C.

3.2.2. Vergleich der untersuchten Lipide

Abb. 21[1] faßt die thermodynamischen Daten der untersuchten Lipidphasenübergänge mit Vergleichslipiden (DPPC, DHPC) in einem Blockdiagramm zusammen.

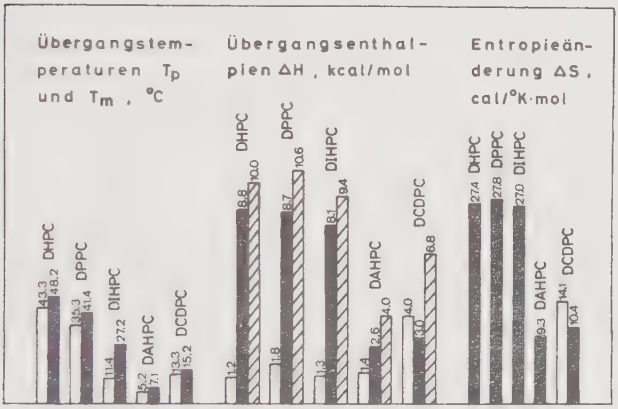


Abb. 21: Blockdiagramm der thermodynamischen Daten der im Bild bezeichneten Lipide; helle Blöcke repräsentieren die Vorumwandlung, dunkle die Hauptumwandlung und die Schrägschraffur steht für den Gesamtprozeß.

1) Das Kalorigramm von DPPC wurde mir dankenswerterweise von Herrn Dr. Blume zur Verfügung gestellt; die Daten von DHPC stammen aus der Zusammenarbeit mit Herrn Dr. McElhaney, Edmonton, Canada.

Wie aus Abb. 21 ersichtlich, zeigt die Phasenübergangstemperatur für die Vor- und Hauptumwandlung einen abnehmenden Gang von DHPC über DPPC und DIHPC zu DAHPC, während DCDPC seine Hauptumwandlungstemperatur zwischen DIHPC und DAHPC hat, aber seine Vorumwandlungstemperatur über der von DIHPC liegt.

Die Hauptumwandlungsenthalpien ΔH_m der geradkettigen Lipide zeigen gleiche Größe (ΔH_m: 8,7 - 8,8 kcal/mol) und auch DIHPC benötigt mit 8,1 kcal/mol eine nur geringfügig kleinere Übergangsenergie. Drastisch verringerte Übergangsenthalpien zeigen dagegen DAHPC (2,6 kcal/mol) und DCDPC (3,0 kcal/mol).

Betrachtet man die Vorumwandlungen, fällt auf, daß die gerad- und verzweigtkettigen $C_{17:0}$-Lipide alle etwa die gleiche Vorumwandlungsenthalpie haben (1,2 - 1,8 kcal/mol) und nur DCDPC zeigt eine wesentlich erhöhte Enthalpie (4,0 kcal/mol), die über der Hauptumwandlungsenthalpie (3,0 kcal/mol) liegt.

Eine Reihe von Einschränkungen sind hier allerdings nötig. Einmal sind die Energien für DAHPC und DCDPC aus angenommenen Peaksummationen errechnet worden und deshalb wahrscheinlich ungenau und in ihrer Existenz auch unbewiesen. MCELHANEY fand (KANNENBERG et al. 1983), daß die Vorumwandlung von DIHPC von der Liposomenpräparation, der Vortemperierung und der Heizrate der Messung abhängt. Eigene Beobachtungen an DIHPC zeigten, daß die Vorumwandlung in Lage und Größe von der Vorkühlzeit und den Meßparametern abhängt. Die doch recht drastischen Unterschiede in den DAHPC Kalorigrammen könnten ebenfalls auf solche Phänomene zurückzuführen sein.

Die Entropieänderungen der Hauptumwandlung zeigen in etwa das gleiche Bild wie das der Enthalpien. Annähernd gleiche Entropieänderungen für DHPC, DPPC und DIHPC und eine drastisch abgesenkte Übergangsentropie für DAHPC und DCDPC.

Das Temperaturintervall zwischen Vor- und Hauptumwandlung beträgt für DHPC und DPPC etwa 5^oC, für DIHPC angenähert 16^oC und für DAHPC und DCDPC etwa 2^oC.

Für die Kooperativität des Phasenübergangs läßt sich aus den gemessenen van't Hoffschen Reaktionsenthalpien und dem Peakaussehen eine abgestufte Kooperativität ableiten, mit der höchsten für geradkettige PCs, einer stark verminderten für verzweigte und der geringsten Kooperativität für DCDPC.

3.2.3. Lipidmischungen mit THBH

Wegen der in der Literatur gut beschriebenen Wirkung von Cholesterin im DPPC-Modell wurde auch die Wirkung von THBH in diesem System untersucht.

Abb. 22 zeigt die Wirkung von THBH auf die Umwandlungskurve von DPPC.

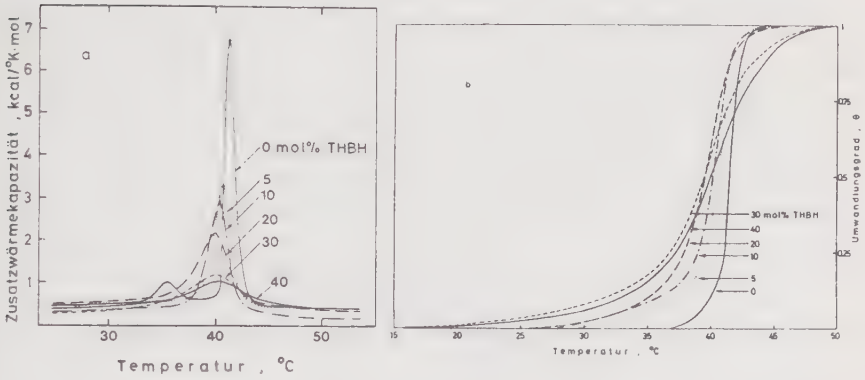


Abb. 22: DSC-Kalorigramme a) von multilamellaren DPPC-Dispersionen in Wasser mit wechselnden Konzentrationen an THBH;
b) Normierte Umwandlungskurven der gleichen DPPC/THBH-Dispersionen; Lipidkonzentration an DPPC: 0,32 - 0,66 µmol/ml; Heizrate: 2°C/min.

Bereits bei einer Konzentration an THBH von 5 mol% ist die Vorumwandlung des reinen Lipids nicht mehr sichtbar.

Die Wirkung von THBH auf die thermotrope Hauptumwandlung von DPPC ist in Abb. 23 und Abb. 24 aufgeschlüsselt.

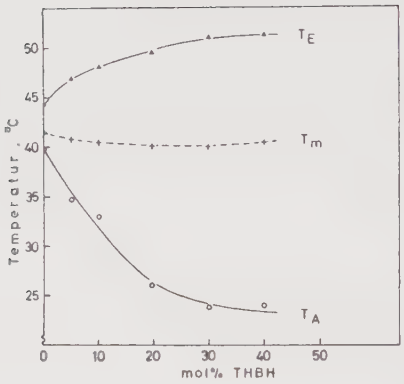


Abb. 23: Phasendiagramm der thermotropen Hauptumwandlung von DPPC in Abhängigkeit von der THBH-Konzentration; T_A = Anfangstemperatur des Phasenübergangs; T_E = Endtemperatur des Phasenübergangs; T_m = Phasenübergangstemperatur; Lipidkonzentration: 0,32 - 0,66 µmol/ml; Heizrate: 2°C/min.

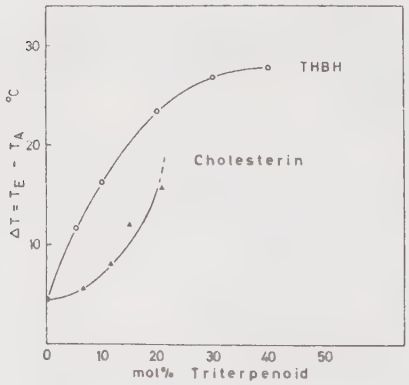


Abb. 24: Abhängigkeit des Temperaturintervalls ΔT der DPPC-Phasenumwandlung von der Konzentration an THBH; Lipidkonzentration: 0,32 - 0,66 µmol/ml; Heizrate: 2°C/min; die DPPC-Cholesterinkurve ist aus ESTEP et al. (1978) übernommen und wurde auf die gemessene DPPC-Umwandlung normiert.

Anders als beim DPPC und vergleichbar der Wirkung von Cholesterin in DPPE (BLUME, 1980) bewirken auch niedrige Konzentrationen an THBH eine starke Verbreiterung des Temperaturumwandlungsintervalls (Abb. 23 und 24). Im Gegensatz dazu gleicht die Wirkung auf die Phasenübergangstemperatur stark der Wirkung von Cholesterin in DPPC. Bis etwa 30 mol% THBH wird T_m lediglich um 1,4°C abgesenkt und steigt gar für 40 mol% THBH wieder um 0,4°C an. Die Kalorigramme zeigen bis 30 mol% THBH streng symmetrischen Aufbau und lediglich die Kurve für 40 mol% THBH flacht langsamer auf der Seite der ansteigenden Temperaturen ab. Bis 20 mol% THBH zeigen die Kurven ein scharfes Peakmaximum, das für 30 und 40 mol% THBH nur noch abgeflacht existiert.
Der Einfluß auf die Phasenumwandlungsenthalpie ΔH_m ist in Abb. 25 dargestellt. Auffallend ist einmal die mit 7,2 kcal/mol für 5 mol% THBH stärker abgesenkte Übergangsenthalpie als sie bei gleicher Konzentration Cholesterin zeigt (7,9 kcal/mol) und dann die für höhere Konzentrationen an THBH doch wesentlich schwächere Wirkung auf die Phasenübergangsenthalpie.

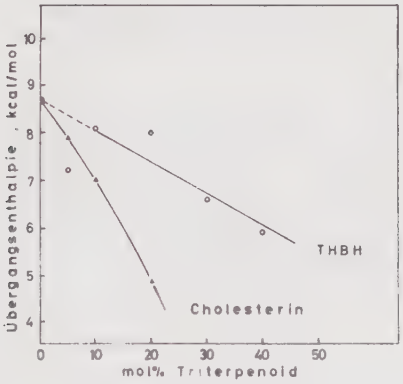


Abb. 25: Die Phasenübergangsenthalpie ΔH_m von DPPC in ihrer Abhängigkeit von wechselnden Konzentrationen an THBH.
Lipidkonzentration 0,32 - 0,66 µmol/ml; Heizrate 2°C/min;
die Cholesterinwerte wurden ESTEP et al. (1978) entnommen.

Nach der durch lineare Regression ermittelten Ausgleichsgeraden für die Abhängigkeit der Übergangsenthalpie von der THBH-Konzentration (unter Auslassung des Wertes für 5 mol% THBH) wird die Übergangsenthalpie nur von THBH-Konzentrationen > 100 mol% gelöscht, scheint also nicht möglich. Überraschend war, daß die Umwandlung der DPPC-Dispersion mit 50 mol% THBH eine Umwandlungsenthalpie von > 9 kcal/mol mit einem ausgeprägten Peakmaximum zeigte. Dieser Wert wurde hier nicht weiter berücksichtigt, weil er noch nicht reproduziert worden ist.
Die Kooperativität des Umwandlungsprozesses fiel von CU > 200 für reines DPPC auf CU = 40 mit 5 mol%, CU = 33 mit 10 mol%, CU = 21 mit 20 mol%, CU = 15 mit 30 mol% und CU = 15 mit 40 mol% THBH.

Eine DIHPC-Dispersion mit 10 mol% THBH zeigte eine um jeweils etwa $1^{o}C$ erniedrigte Vor- (T_p = $10^{o}C$), bzw. Hauptumwandlung (T_m = $26,1^{o}C$). Die Vorumwandlung war kaum noch sichtbar, während die Hauptumwandlung ein scharfes Peakmaximum bei $26,1^{o}C$ hatte, mit asymmetrischem Peakaufbau - den langsamen Aufstieg auf der Peakflanke mit fallenden Temperaturen -. Das Temperaturintervall ΔT des phasenübergangs war um etwa $3^{o}C$ gegen das reine DIHPC verbreitert. Die Übergangsenthalpie lag mit 6,6 kcal/mol um 1,5 kcal/mol unter der von DIHPC. Die Wirkung von THBH ist demnach in diesem System stärker als im DPPC-Modellsystem ($\Delta H_m^{DPPC} - \Delta H_m^{DPPC/THBH}$: 0,6 kcal/mol für 10 mol% THBH).
Dispersionen mit 20 mol% THBH zeigten bei $15,5^{o}C$ eine stärkere Vorumwandlung als in reinem DIHPC. Die Hauptumwandlung, bei ebenfalls $26,1^{o}C$, war in ihrem Peakmaximum erniedrigt und zeigte stärker ausgeprägt die oben beschriebene Asymmetrie. Für den Gesamtprozeß wurde die überraschend hohe Übergangsenthalpie von 10,2 kcal/mol gemessen - vermutlich ist die Integration stark fehlerbehaftet wegen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Peakbasis.

3.2.4. Diskussion der kalorimetrischen Daten

3.2.4.1. PC-Messungen

Multilamellare Liposomendispersionen (zusammenfassend BANGHAM, 1972) wurden in ihren thermodynamischen Daten verglichen.

PCs zeigen einen Phasenübergang (Hauptumwandlung) von der L-β' kristallinen Phase (Gelphase) zur L-α' flüssig-kristallinen Phase. Dazwischen kann noch eine Vorumwandlung von der L-β' zur P-β' kristallinen Phase liegen (zusammenfassend SACKMANN, 1982). Die thermotrope Hauptumwandlung ist durch einen scharfen, symmetrischen, relativ energiereichen, endothermen Übergang erster Ordnung charakterisiert. Der breitere, endotherme Übergang geringerer Enthalpie der Vorumwandlung liegt etwa 5 - 10°C unter der kristallinen - flüssig-kristallinen Umwandlung (MABREY, STURTEVANT, 1978).
Die Acylketten gehen durch die hochkooperative, reversible Hauptumwandlung von einer weitgehenden all-trans-Konfiguration in der Gelphase in den ungeordneteren Zustand der flüssig-kristallinen Phase über, der durch eine erhöhte Zahl an gauche-Konformationen und durch größere intra- und intermolekulare Beweglichkeit charakterisiert ist (CHAPMAN et al., 1967; LEVINE, 1972; CHAPMAN, 1975).
Die an gleichkettigen Lipiden gemachten Untersuchungen brachten Abhängigkeiten der Phasenübergangstemperatur und der Phasenübergangsenthalpie von der Art der Lipidkopfgruppe, der Acylkettenlänge und den sterischen Besonderheiten, z.B. Doppelbindung, der Fettsäureketten (CHAPMAN et al., 1967; LADBROOKE, CHAPMAN, 1969; HINZ, STURTEVANT, 1972; CHAPMAN et al., 1974; VAUGHAN, KEOUGH,1974; VERVERGAERT et al., 1975; MABREY, STURTEVANT, 1976).
Allgemein wächst innerhalb einer Kopfgruppe die Übergangstemperatur, die -entnalpie und -entropie mit der Kettenlänge der Fettsäuren, während die genannten Größen mit der Einführung von Doppelbindungen fallen. Diese Befunde zeigen, daß weitgehend die hydrophoben Van-der-Waals Wechselwirkungen der Acylketten das thermodynamische Verhalten determinieren, wie es etwa auch an der Wiederholung des gerade-ungerade Kettenmusters der Schmelztemperaturen der reinen Fettsäuren auf der Ebene der PCs sichtbar wird (SILVIUS, MCELHANEY, 1979a,b).

Die Auswahl der untersuchten Lipide erfolgte bei identischer Kopfgruppe nach gleicher oder annähernd gleicher Länge der Acylketten. Daher sollten DIHPC, DAHPC und DCDPC angenähert gleiche Eintauchtiefe in den Bilayer wie DPPC haben und in ihren thermodynamischen Daten die sterischen Effekte dieser Moleküle hauptsächlich auf die hydrophoben Wechselwirkungen widerspiegeln.

Lipid Typ	Bezeichnung	Gesamtprozeß T	ΔH_{Ges}	ΔS	$\Delta H_{V.H.}$	CU	Vorumwandl. T_p	ΔH_p	Hauptumwandlung T_m	ΔH_m	ΔS_m	$\Delta H_{v.H.}$	CU	Literatur
		°C	kcal/mol	cal/°K.mol	kcal/mol		°C	kcal/mol	°C	kcal/mol	cal/°K.mol	kcal/mol		
gerad-ket-tige PCs	DMPC $C_{14:0}$		6,4											
	DPPC $C_{16:0}$		10,6				14,2	1,0	23,9	5,4	18,3		>330	MABREY, STURTEVANT (1978)
	DHPC $C_{17:0}$		10,0				35,3	1,8	41,4	8,7	27,8	2272,5	260	MABREY, STURTEVANT (1978)
	DSPC $C_{18:0}$		12,5				43,3	1,2	48,2	8,8	27,4		>200	KANNENBERG et al. (1983)
unge-sättig-te PCs	DEPC $C_{18:1}$ trans	11,7	5,8	20,4			51,5	1,85	54,9	10,6	32,3		130	MABREY, STURTEVANT (1978)
	DOPC $C_{18:1}$ cis	-22	7,6	30,3										BLUME (1976)
	Ei-PC	-19,0	3,7	14,0										PHILLIPS et al. (1972)
ver-zweigte PCs	DIHPC $C_{17:0}^{i}$	26,8	9,4		291	31	11,4	1,3	27,2 27,6	8,1 8,1±0,3	27,0 26,9	238	29,5	BLUME (1976) eigene Messung MCELHANEY aus KANNENBERG et al. (1983)
	DAHPC $C_{17:0}^{ai}$	6,6	4,0 6,3±0,4	~14,2 22,9	172	43	5,2 5,2	1,4 3,5	7,1 8,3	2,6 2,86	9,3 10,3			eigene Messung MCELHANEY aus KANNENBERG et al. (1983)
ω-cyc lohexan PCs	DCUPC $C_{17:0}^{\omega\text{-cyc}}$	13	7,6	26,6										ENDO et al. (1982)
	DCDPC $C_{18:0}^{\omega\text{-cyc}}$	13,8	6,8	~23,8	102	15	13,3	4,0	15,2	3,0	10,4			eigene Messung
	DCTPC $C_{19:0}^{\omega\text{-cyc}}$	33,5	10,3	33,4										ENDO et al., (1982)

Tab. 3: Kalorimetrische Daten reiner PCs mit unterschiedlichen Acylketten

Aus Tab. 3 wird ersichtlich, daß DIHPC, vergleicht man es mit DPPC, einen etwa 14°C niedrigeren Phasenübergang hat, daß aber die Übergangsenthalpie und -entropie nur wenig kleiner als die DPPC-Werte sind. DAHPC hat dagegen sowohl eine stark erniedrigte Übergangsenthalpie und -entropie als auch eine erheblich abgesenkte Phasenübergangstemperatur (34,3°C).

Obwohl thermodynamische Daten direkt keine strukturellen Informationen liefern, läßt sich doch aus den erniedrigten Phasenübergangstemperaturen, der abgesenkten Enthalpie und Entropie auf höhere Energie und geringeren Ordnungsgrad der Gelphase in DIHPC und DAHPC schließen (KANNENBERG et al., 1983). Dabei scheint der Effekt einer iso-Verzweigung gering, verglichen mit der isomeren anteiso-Verzweigung in der Acylkette; quantitativ liegt er für die iso-Verzweigung in der Größenordnung einer 2 C-Kettenverkürzung, während die anteiso-Verzweigung einen geringeren Effekt als eine cis-Doppelbindung hat, der aber doch in der Größe einer trans-Doppelbindung liegt (PHILLIPS et al., 1969; PHILLIPS et al., 1972; MCELHANEY, 1982; BLUME, 1976).
Aufgrund der abgesenkten Phasenübergangstemperatur, verglichen mit den geradkettigen Homologen DHPC und DPPC, sollten DIHPC und DAHPC verflüssigend in physiologischen Membranen wirken (SILVIUS, MCELHANEY, 1979a,b).

In seinen strukturellen Ursachen ein nicht restlos geklärtes Phänomen ist das der Vorumwandlung (MABRAY, STURTEVANT, 1978). Nach Untersuchungen an geradkettigen PCs wird eine Reorganisation der Gelphase vorgeschlagen, als deren Ursachen Konformationsänderungen in der Kopfgruppe, die Aufrichtung der Acylketten von abgewinkelt zu senkrecht gegen die Membranebene und die Ausbildung einer "ripple"-Struktur diskutiert werden (TARDIEU et al.,1973; CHAPMAN et al., 1974; MICHAELSON et al., 1974; SALSBURY et al., 1972; GALLY et al. 1975; GALLA, SACKMANN, 1974; JACOBSON, PAPAHADJOPOULOS, 1975; JANIAK et al. 1976).
Die starke Abhängigkeit der Vorumwandlung von DIHPC von der Vorgeschichte der Liposomenpräparation, ebenso die erhebliche Diskrepanz der Vorumwandlungsenergien zwischen den verschiedenen Kalorigrammen für DAHPC und letztlich die Temperaturintervalle zur Hauptumwandlung (DIHPC: ΔT = 15,8°C; DAHPC: ΔT = 1,9°C) lassen bezweifeln, ob es sich um die von geradkettigen PCs bekannten Vorumwandlungen handelt. SILVIUS, MCELHANEY (1979a) fanden für iso-PCs Hinweise, daß sie unterhalb des Phasenübergangs in

in zwei alternativen Packungszuständen mit verschiedenen Übergangstemperaturen existieren können. Zu ähnlichen Schlüssen kommen sie auch in der Diskussion von anteiso-PC-Untersuchungen (SILVIUS, MCELHANEY, 1979b). Ob sich mit diesem Ansatz die aufgetretenen Phänomene erklären lassen, müssen kommende Untersuchungen zeigen. Es bleiben also die strukturellen Umwandlungen und die physikalischen Ursachen der Vorumwandlung auch für die untersuchten verzweigten Lipide unklar; die thermodynamischen Daten stimmen aber, mit der Einschränkung des willkürlich angenommenen Peaks für DAHPC, recht gut mit denen überein, die in der Literatur für Vorumwandlungen von geradkettigen PCs beschrieben sind (MCELHANEY, 1982).

Verglichen mit der sekundären Butylgruppe von DAHPC trägt DCDPC mit dem Cyclohexanring die voluminösere Endgruppe (DAHPC: 4,7 x 5,0 Å; DCDPC: 5,2 x 6,5 Å). Trotzdem stehen die thermodynamischen Daten in keinerlei Kontinuität zu den untersuchten DIHPC und DAHPC. Während den Acylkettendimensionen nach zu urteilen die geringste Übergangstemperatur, -enthalpie und -entropie zu erwarten wären, zeigt es eine Phasenübergangstemperatur zwischen DIHPC und DAHPC und eine erstaunlich hohe Übergangsenthalpie und Entropie (Tab. 3). Das Kalorigramm zeigt ein Doppelmaximum mit nur gering unterschiedlichen Übergangstemperaturen ($T_m - T_p = 1,9^oC$). Geht man von der in Abb. 20 eingezeichneten Peaküberlagerung aus, zerfällt die Umwandlung in zwei annähernd gleich energieintensive Schritte, mit den größeren Werten in der Vorumwandlung. Diese Daten sprechen für zwei strukturelle Umwandlungen von geringer, annähernd gleicher Enthalpie und unter nur geringer Erhöhung der Entropie, d.h. mit nur relativ geringer Zunahme der Acylkettenunordnung. Dieses Verhalten war in Wiederholungsmessungen der gleichen Lipiddispersion und nach Neupräparierung der Liposomen reproduzierbar. Ein Zusammenhang des thermotropen Verhaltens mit der, verglichen mit DPPC, geringfügig kürzeren Acylkette ist wohl nicht gegeben, so daß die Umwandlung in struktureller Hinsicht und in ihren physikalischen Ursachen stark von den oben diskutierten Umwandlungen abweichen könnte. Dafür spricht auch die mit CU = 15 äußerst geringe Kooperativität für den Gesamtprozeß, die auch nach Auflösung in die beiden Umwandlungsschritte nur für die angenommene Hauptumwandlung etwas höher sein dürfte.
ENDO et al. (1982) haben das um ein C-Atom längere bzw. kürzere homologe Lipid zu DCDPC untersucht (DCUPC, DCTPC) und fanden thermotrope Umwandlungen ohne Vorumwandlung. Auf der Basis der Umwandlungsintervalle der

Temperatur sind allerdings alle drei Lipide gleich (T_E - T_A: 15 - 17°C). Da die Umwandlungskurven außerdem unsymmetrisch sind, mit flacherem Anstieg auf der Seite der niedrigen Temperaturen, bleibt abzuwarten, ob bei kommenden Messungen nicht die Auflösung der Peakschulter gelingt.

3.2.4.2. DPPC/THBH-Mischungen

Das weitverbreitete Auftreten von Cholesterin und Cholesterin-Derivaten in eukaryotischen Membranen (z.B. ROUSER et al.,1968) führte zu einer großen Zahl von Untersuchungen über die Wirkung von Cholesterin auf Phospholipide.
Die Wirkung von Cholesterin in DPPC-Dispersion wird in älteren Arbeiten in einer proportionalen Abnahme der Übergangsenthalpie (ΔH_m = 0 kcal/mol bei 33 mol% Cholesterin) beschrieben, unter starker Verbreiterung des Temperaturintervalls der Umwandlung (HINZ , STURTEVANT, 1972). Aus der Beobachtung, daß für höhere Cholesterin-Konzentrationen eine schwache aber kontinuierliche Zunahme der spezifischen Wärme mit der Temperatur existiert (STURTEVANT, 1974), schloß man, daß bei diesen Konzentrationen eine nichtkooperative Fluidisierung der Acylketten stattfindet (MABREY, STURTEVANT, 1978).
Mit dem empfindlichen und hochauflösenden Privalov-Kalorimeter konnte gezeigt werden, daß sich für Cholesterin-Konzentrationen bis 25 mol% die Phasenübergänge aus einer scharfen Übergangskomponente mit T_m-Werten wenig unter 41,4°C und einer breiten Komponente mit geringfügig höheren Übergangstemperaturen zusammensetzen.Die Übergangsenthalpie der scharfen Komponente, bei der es sich wahrscheinlich um reine DPPC-Domänen handelt, nimmt linear ab und verschwindet bei einem Cholesteringehalt von 25 mol%. Die breite Komponente, die einem cholesterinreichen Bereich zugeordnet wird, wächst in ihrer Übergangsenthalpie von ΔH_m = 0 bis auf 3 kcal/mol für 25 mol% Cholesterin und wird bei etwa 50 mol% Cholesterin wieder Null. Damit einher geht eine starke Verbreitung des Umwandlungsintervalls oberhalb von 20 mol% Cholesterin und eine stärkere Verschiebung des Maximums zu höheren Temperaturen (ESTEP et al., 1978; MABREY et al. 1978).

Die Untersuchungen mit Hilfe der Kalorimetertechnik und anderen physikalischen Techniken führten zu der allgemein akzeptierten Ansicht, daß Cholesterin wesentlich die Fluidität von Membranen beeinflußt. Seine Rolle

oberhalb der Phasenumwandlung wird als membranverfestigend beschrieben, während es unterhalb von T_m verflüssigend wirkt, woraus bei genügender Cholesterin-Konzentration ein intermediärer Membranzustand resultiert (zusammenfassend DEMEL, DE KRUYFF, 1976).

Die Wirkung von THBH auf die Vorumwandlung von DPPC scheint vergleichbar mit der von Cholesterin, da sie bei 5 mol% THBH nicht mehr sichtbar war. In der Literatur sind zu ihrer Löschung 3,6 und 6 mol% Cholesterin beschrieben (ESTEP et al., 1978; LADBROOKE et al. 1968).
In der Wirkung auf die Hauptumwandlung ist THBH der Cholesterinwirkung ähnlich.
Anders als DPPC/Cholesterin-Mischungen zeigen DPPC/THBH-Mischungen aber nicht die starke Asymmetrie in ihren Umwandlungskurven, d.h. die Peaksymmetrie läßt nicht ohne weiteres auf eine Überlagerung zweier verschieden gestalteter energieabhängiger Prozesse schließen. Wie in Abb. 26 der Temperaturintervalle in halber Peakhöhe $\Delta T_{1/2}$ zu sehen ist, zeigen diese Werte aber einen stärkeren Anstieg für Werte größer als 20 mol% THBH.

Für das mit verschiedenen Techniken gut untersuchte Modellsystem DPPC/Cholesterin gibt es keine allgemein akzeptierte Theorie, die die im Kalorimeter sichtbaren energetischen Vorgänge beschreibt. MABREY et al. (1978) und ESTEP et al. (1978) gehen von zwei Phasen innerhalb des Umwandlungsbereiches und für Cholesterin-Konzentrationen unter 20 - 25 mol% aus, wobei der scharfe Peak des Kalorigramms einer cholesterinarmen oder ganz cholesterinfreien Phospholipidregion zugeordnet wird, während der breite Peak eine cholesterinreiche Region sein soll, deren Natur noch unklar ist, die aber auch für Cholesterin-Konzentrationen von über 40 mol% noch einen langgezogenen wenig kooperativen Phasenübergang zeigt. Andere Autoren schließen aus Gefrierbruch-, NMR- und Kalorimeterexperimenten, daß auch Gemische mit weniger als 25 mol% Cholesterin eine homogene Phasenverteilung zeigen (OWICKI, MCCONNELL, 1979; RUBINSTEIN et al., 1979; VERKLEIJ et al., 1974; JACOBS,OLDFIELD, 1979; HABERKORN et al. 1977).

Da für das System DPPC/THBH noch jegliche Untersuchungen fehlen, die direkte Aussagen über strukturelle Umwandlungen der Moleküle erlauben, ist die Interpretation der DPPC/THBH-Interaktion noch willkürlich und in Analogiebetrachtung zu der DPPC/Cholesterin-Wirkung entstanden.

Die starke Peakverbreiterung auch bei 5 mol% THBH (Abb. 24), die stärker ist als die Wirkung von Cholesterin in DPPC, spricht für eine weitgehend homogene Verteilung von THBH, die sich erheblich auf die Kooperativität des Systems auswirkt. Weniger verständlich aus dieser Sicht ist, warum die Phasenübergangstemperatur nur wenig beeinflußt wird. Ihre beinahe unveränderte Größe spricht für weitgehend THBH freie Domänen, die möglicherweise als Mikroregionen die aus dem reinen Lipid bekannten Hauptumwandlungen zeigen, wenn auch mit geringerer Kooperativität. Ähnlich wie LADBROOKE, CHAPMAN (1969) für verschiedene Cholesterin-Derivate von verschiedenen Löslichkeiten in der Bilayermatrix von Lipiden ausgehen, könnte man bei nicht allzu hoher Löslichkeit von THBH in DPPC ein Auskristallisieren im Bilayer erwarten, d.h. Regionen mit hoher oder reiner THBH-Zusammensetzung. Für niedrige Konzentrationen wäre demnach die homogenste Verteilung und die stärkste Wirkung im kristallinen Gefüge von DPPC zu erwarten. Tatsächlich sprechen die große Wirkung auf die Kooperativität und die Übergangsenthalpie bei 5 mol% THBH für ein solches Modell. Bei höheren Konzentrationen könnte laterale Separation zur Fusion der THBH-Regionen führen und größer werdende kristalline THBH-Bereiche könnten nur noch an ihren Phasengrenzen Einfluß auf die DPPC-Regionen nehmen. Konsequenz daraus wäre die gegen Cholesterin tatsächlich stark verminderte Wirkung für höhere Konzentrationen. Erklärbar wäre nach diesem Modell auch die Tatsache, daß der Phasenübergang von DPPC letztlich nicht zu löschen ist. Unerklärt bleibt der, wenn auch geringe, Knick in den $\Delta T_{1/2}$-Werten (Abb. 26).

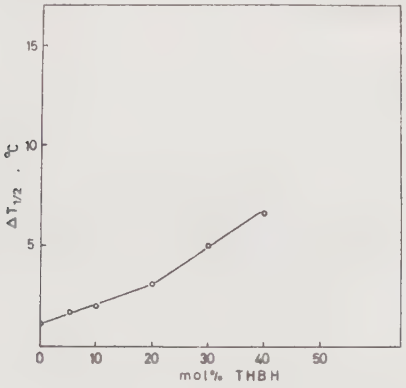


Abb. 26: Abhängigkeit des Temperaturintervalls in halber Peakhöhe der DPPC-Umwandlung von der Konzentration an THBH

Der wesentlich stärkere Einfluß von niedrigen THBH-Konzentrationen auf die Übergangsenthalpie von DIHPC, verglichen mit DPPC, spricht für eine stärkere Wirkung von THBH auf DIHPC, wie sie für DPPC beobachtet wurde. Leider fehlt noch ein systematischer Überblick, jedoch deutet sich für THBH eine stark lipidsortenabhängige Interaktion an.

3.3. Monolayeruntersuchungen

Mit der Monolayer-Methode ist der Flächenbedarf pro Molekül in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmbar, ebenso ein Phasenübergang im Meßintervall sowie die Druckabhängigkeit der genannten Größen. Insbesondere ist der molekulare Flächenbedarf auch von Lipidmischungen meßbar. Abweichungen von den additiv zu erwartenden Flächen sind ein direktes Maß für die Interaktion der Moleküle.
Die homologen Phospholipide DPPC, DIHPC, DAHPC und DCDPC sowie Cholesterin und die aus B.a. und M.o. isolierten Hopanoide wurden als reine Systeme und in binären Mischungen untersucht.

3.3.1. Cholesterin und Hopanoide

Nach PETHICA (1955) bildet Cholesterin einen flüssig-kondensierten ("liquid-condensed"),monomolekularen Film geringer Kompressibilität, einen sogenannten "harten" Film.

In Abb. 27 sind Isotherme und Isobare für Cholesterin dargestellt. Tab. 4 faßt die Monolayerdaten dieser Kurven zusammen.

Die in der Literatur publizierten molekularen Flächen für Cholesterin-Filme schwanken zwischen 36,7 und 39,5 $Å^2$/Molekül (EVANS, TINOCO 1978; ALBRECHT et al., 1981; MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979). Die mit einem Filmdruck von 25 dyn/cm gemessene molekulare Fläche von 38 $Å^2$/Molekül entspricht gut diesen Literaturwerten.

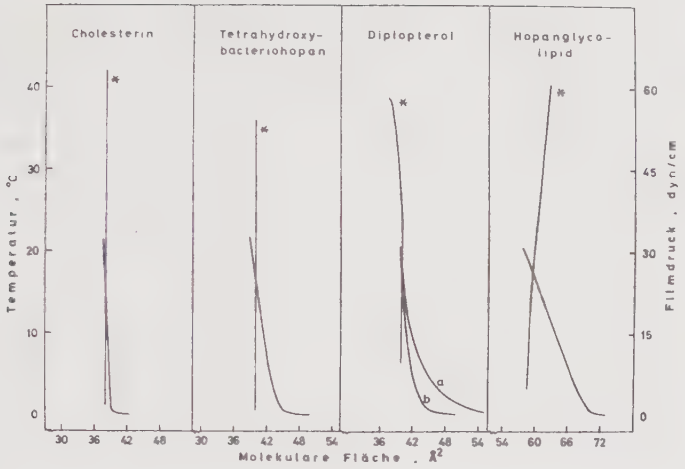


Abb. 27: Filmdruck und Temperatur als Funktion der molekularen Fläche von Cholesterin und den eingesetzten Hopanderivaten: die mit * bezeichneten Isobaren wurden bei π = 25 dyn/cm aufgenommen; die Isothermen bei 22°C; die Isobare von Diplopterol wurde bei 18 dyn/cm aufgenommen; a, b zwei aufeinanderfolgende Diplopterolisothermen

Ebenfalls in Abb. 27 und Tab. 4 sind die Monolayerkurven und die daraus ermittelten Daten der untersuchten Hopanoide zusammengefaßt.

THBH zeigt im komprimierten Lipidfilm keine Temperaturabhängigkeit und verhält sich wie ein ideal "harter Film".
Ein Problem besteht im Flächenbedarf des Moleküls. Für Cholesterin errechnet sich aus den in Abb. 14 gegebenen Kalottendimensionen ein rechteckiger Querschnitt für das Molekül von 41,6 $Å^2$. Die mit eingewogenem Cholesterin gemessene molekulare Fläche betrug 38 $Å^2$. Der nicht kalkulierbare reale Flächenschwund scheint in diesem Fall akzeptabel. Mit

Lipid	molekulare Fläche F π = 25 dyn/cm		Flächenänderung $\Delta F = F_{40^oC} - F_{4^oC}$	Druckänderung $\frac{\Delta \pi}{\Delta F}$ der Isotherme $T = 22^o$; π = 25 dyn/cm
	4^oC	40^oC		
	$Å^2$/Molekül	$Å^2$/Molekül	$Å^2$/Molekül	dyn/cm $Å^2$
Cholesterin	38	38	0	23,8
THBH	40	40	0	6,7
Diptopterol	40	40 (21^oC)	0	10,9
	π = 18 dyn/cm)			
HGL	58,6	62,5	3,9	2,6

Tab. 4: Monolayerdaten der untersuchten Triterpenoide

den in Abb. 15 angegebenen Dimensionen errechnet sich für THBH ein Querschnitt von 44,7 $Å^2$/Molekül. Der durch Einwaage von THBH bestimmte Flächenbedarf von 35 $Å^2$/Molekül schien daher zu niedrig, und er wurde auf den plausibel erscheinenden Betrag von 40 $Å^2$/Molekül normiert.

Diplopterol zeigt in der Isobare (Abb. 27) ebenfalls idealtypisch das Verhalten eines "harten Films". Allerdings scheint der Film nicht sehr stabil. Bei einem lateralen Druck von π = 25 dyn/cm kollabierte der Film sofort und nach der Erniedrigung auf einen Filmdruck von π = 18 dyn/cm war er nur bis 21°C temperaturunabhängig; oberhalb dieser Temperatur war ein zunehmender Flächenschwund zu beobachten. In Isothermen war der Film kondensiert, in seinem Verhalten aber nicht eindeutig. In zwei aufeinanderfolgenden Läufen war die erste der Isothermen zu höheren Flächen verschoben, mit einer ebenfalls höheren Kompressibilität. Diesem Verhalten nach wird eine lockere Formation der Moleküle durch lateralen Druck zu einer dichten Packung transformiert, die dann auch weitgehend beibehalten bleibt. Im linearen Bereich der Isotherme der dichter gepackten Moleküle war der Druckanstieg pro 1 $Å^2$ mit 10,9 dyn/cm nur etwa um die Hälfte geringer als der von Cholesterin, was auf eine weitgehend dichte Packung auch bei niedrigen Drücken schließen läßt.
Mit der absoluten Flächenbestimmung gibt es das gleiche Problem, wie es schon für THBH geschildert wurde. Da Diplopterol, wie Abb. 16 zu entnehmen ist, lediglich in der Seitenkette verkürzt ist, lag es nahe, die gleiche Flächennormierung wie für THBH auf 40 $Å^2$/Molekül vorzunehmen.

In dem in Abschnitt 3.1.2.2. näher beschriebenen HGL ist neben dem apolaren Kohlenwasserstoffgerüst und den polaren Hydroxylgruppen noch als weitere hydrophobe Gruppe eine Fettsäure in das Molekül integriert. Das verwendete Präparat ist heterogen, da es verschiedene Fettsäuren enthält.
Die Isobare (Abb. 27; Tab. 3) von HGL zeigt zwischen 6°C und 40°C eine Flächenzunahme von 4 $Å^2$/Molekül. Die Flächenzunahme erfolgt annähernd linear mit der Temperatur. Die Kompressibilität der 22°C Isotherme ist etwa zehnfach höher als die von Cholesterin. Das Verhalten der Isotherme spricht dafür, daß HGL einen flüssig kondensierten Film mit geringerer Packungsdichte als Cholesterin, THBH und Diplopterol bildet. Die Interpretation wird auch durch die lineare Flächenzunahme der Isobare mit der

Temperatur gestützt, deren Größe aber weit geringer als die für Phasenübergänge gemessenen Flächenänderungen ist.

Die Bestimmung der absoluten Molekülfläche brachte wiederum das schon diskutierte Problem. Bei angenommener Flächenaddierung von THBH-Fläche (40 $Å^2$/Molekül) und Fettsäure (~ 20 $Å^2$/Molekül) sollte HGL wenigstens eine molekulare Fläche von 60 $Å^2$/Molekül zeigen: Die mit Gewichtseinwaage ermittelte Fläche von 45 $Å^2$/Molekül (π = 25 dyn/cm, 20°C) schien wesentlich zu niedrig, und sie wurde daher auf die oben erwähnten 60 $Å^2$/Molekül normiert. Die Messungen am HGL-Kalottenmolekül, mit einer $C_{18:0}$ω-cyc-Fs, ergaben allerdings Molekülquerschnitte von 80 bis 91 $Å^2$/Molekül, je nach Molekülkonformation. Da ein Molekül mit Heterogenität (verschiedene Fettsäurereste) und keine Angaben über die Konformation vorliegen, wurde die schon früher verwendete Normierung beibehalten.

3.3.2. Phosphatidylcholine

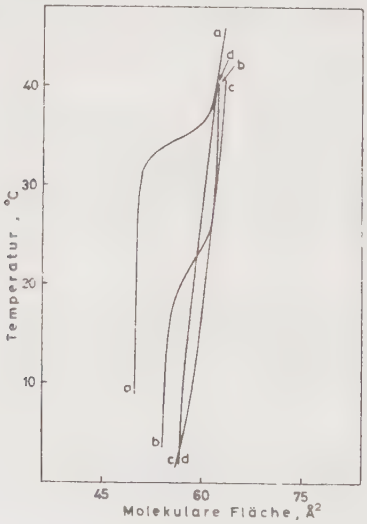


Abb. 28: Abhängigkeit der molekularen Fläche von der Temperatur der hier untersuchten PCs, bei einem lateralen Druck von 25 dyn/cm: a) DPPC, b) DIHPC, c) DAHPC, d) DCDPC

DPPC zeigt in der Isothermen und Isobaren (Abb. 28, 29) den für dieses System typischen Phasenübergang von der flüssig-expandierten zur flüssig-kondensierten Phase einmal durch Druck und im zweiten Fall durch Temperatur ausgelöst. Die aus den Kurven ermittelten Monolayerdaten sind in Tab. 5 aufgelistet. Die gefundenen Werte stimmen gut mit Literaturwerten überein (MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979; ALBRECHT et al., 1981; BLUME unveröffentlicht).

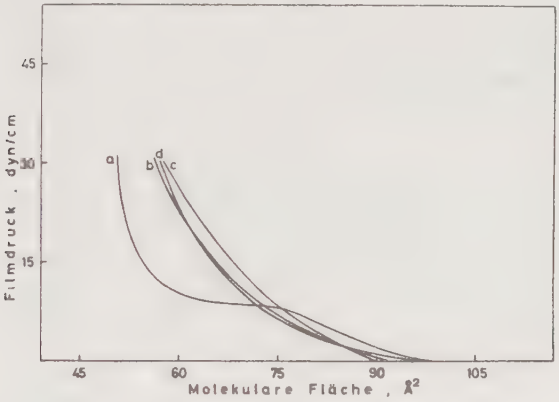


Abb. 29: Filmdruck/Flächen-Diagramme (Isothermen) der untersuchten PCs bei 22°C Meßtemperatur: a) DPPC, b) DIHPC, c) DAHPC, d) DCDPC

Für DIHPC konnte bei einem Filmdruck von 25 dyn/cm ein Phasenübergang bei 21,3°C gemessen werden (Abb. 28; Tab. 5). Die molekulare Fläche entsprach oberhalb des Phasenübergangs der von DPPC, während der Flächenbedarf des Lipids unterhalb des Phasenübergangs jedoch erheblich über dem von DPPC lag (Tab. 5). Die Isotherme bei 22°C gibt lediglich die Druckabhängigkeit der flüssig-expandierten Phase an (Abb. 29).

Lipid	molekulare Fläche F π = 25 dyn/cm		Flächenänderung $\Delta F = F_{40^\circ C} - F_{4^\circ C}$	Druckänderung $\frac{\Delta \pi}{\Delta F}$ der Isotherme Isothermentemperatur in Klammern; π = 25 dyn/cm	Phasenübergangs-temperatur T_m Monolayer π= 25 dyn/cm	Phasenübergangs-temperatur T_m Bilayer
	$4^\circ C$	$40^\circ C$				
	$Å^2$/Molekül	$Å^2$/Molekül	$Å^2$/Molekül	dyn/cm $Å^2$	$^\circ C$	$^\circ C$
DPPC	50	62	12	7,5 (T = $22^\circ C$) 0,4 (π = 6 dyn/cm)	34,5	41,4
DIHPC	54,3	62,3	8	2,1 (T = $22^\circ C$)	21,3	26,8
DAHPC	57	63,4	6,4	1,7 (T = $22^\circ C$)	20	6,6
DCDPC	56,7	62,0	5,3	2,6 (T = $19^\circ C$) 3,5 (T = $1^\circ C$)	-	13,8

Tab. 5: Monolayerdaten der untersuchten Phosphatidylcholine

DAHPC zeigt in den Isobaren (π = 25 dyn/cm) keinen Phasenübergang, d.h. er liegt unterhalb 0°C und damit außerhalb des Meßbereichs mit Wasser als Subphase (Abb. 28; Tab. 5). Trotzdem läßt die nicht lineare Flächenabnahme für Temperaturen unter 16°C auf einen langgezogenen Phasenübergang schließen, der nicht allzu weit unterhalb von 0°C liegen sollte. Diese Annahme wird auch durch den kalorimetrisch gemessenen Phasenübergang im Bilayer bei 6,6°C gestützt, der nach eigenen Werten und Literaturdaten (BLUME, 1979; SACKMANN, 1982) um etwa 5° bis 10°C über dem des Monolayers (π = 25 dyn/cm) liegt. Der Flächenbedarf bei 40°C ist um etwa 1 Å^2/Molekül über dem von DPPC und DIHPC. Über den Flächenbedarf unterhalb des Phasenübergangs läßt sich nur spekulieren, jedoch scheint er größer als der von DPPC aber auch größer als der von DIHPC. Die Isotherme bei 22°C zeigt ebenfalls nur die Druckabhängigkeit des flüssig-expandierten Zustandes an (Abb. 29).

Für DCDPC wurde im Kalorimeter ein Phasenübergang für die Gesamtumwandlung bei 13,8°C gemessen. Wie im Vorabschnitt dargelegt, wäre im Monolayerfilm bei einem lateralen Druck von 25 dyn/cm ein Phasenübergang zwischen 4 und 9°C zu erwarten. Abb. 30 zeigt, daß DCDPC bei einem Filmdruck

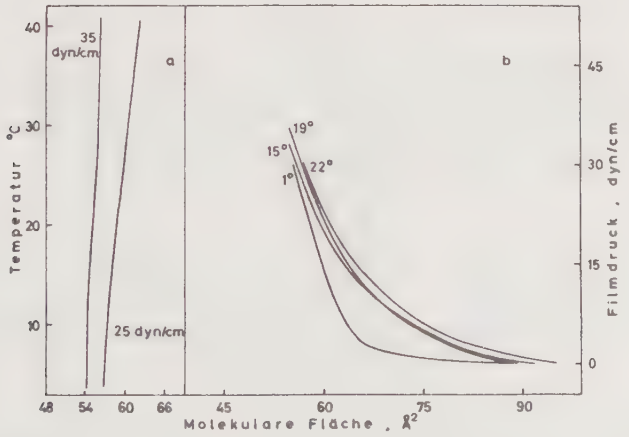


Abb. 30: Filmdruck und Temperatur von DCDPC als Funktion der molekularen Fläche: a) Isobaren, b) Isothermen

25 dyn/cm keinen Phasenübergang hat. Sowohl der Phasenübergang als auch die damit verbundene Flächenänderung sind druckabhängig, wie z.B. für DPPC und DMPC gezeigt wurde (BLUME, 1979; SACKMANN, 1982). Die in diesen Systemen gemessenen Abweichungen des Bilayerübergangs vom Monolayer waren für einen Filmdruck von 35 dyn/cm 0^{o}, bzw. höchstens 2^{o} bis 3^{o}C. Wie aus Abb. 30 ersichtlich wird, weist aber die 35 dyn/cm-Isobare von DCDPC ebenfalls keinen Phasenübergang aus.

Die Isothermen von 15^{o}, 19^{o} und 22^{o}C (Abb. 31) zeigen lediglich die Druckcharakteristik der flüssig-expandierten Phase an (T_m Bilayer: 13,8^{o}C). Überraschenderweise weist die Isotherme bei 1^{o}C einen flüssig-kondensierten Film aus, ohne daß sich ein Phasenübergang, etwa durch ein Plateau im Druckanstieg, andeutet, wie er aber für ein PC zwischen diesen beiden Phasen zu erwarten wäre.

Die molekulare Fläche bei 40^{o}C entspricht der von DPPC und bei 4^{o}C etwa der von DAHPC (Abb. 28; Tab. 5).

3.3.3. Phosphatidylcholin/Triterpenoid-Mischungen[1)]

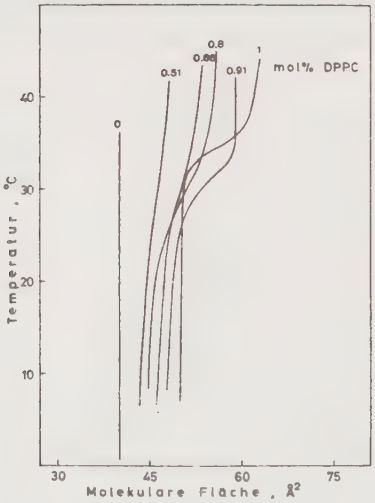


Abb. 31: Isobaren von DPPC und wechselnden Anteilen an Tetrahydroxybacteriohopan (THBH): der laterale Filmdruck war π = 25 dyn/cm

1) Die DPPC/Cholesterin-Messungen wurden mir dankenswerter Weise von Herrn Dr. Blume zur Verfügung gestellt, dem ich darüber hinaus für die weitere statistische Absicherung der DIHPC- und DAHPC-Werte mit THBH und Cholesterin danke.

Abb. 31 zeigt exemplarisch eine Schar Isobaren (π = 25 dyn/cm) von DPPC mit THBH. Die Ergebnisse der im weiteren nicht mehr dargestellten Monolayerisobaren anderer Mischsysteme mit DPPC sind in Abb. 32 und Tab. 6 zusammengefaßt. DPPC hat einen Phasenübergang bei 34,5°C (π = 25 dyn/cm). Bei 10°C und 40°C, den beiden ausgewerteten Temperaturen, ist DPPC in der flüssig-kondensierten bzw. flüssig-expandierten Phase.

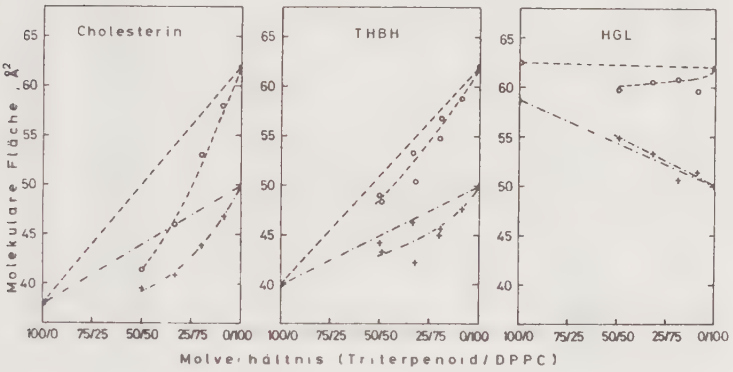


Abb. 32: Molekulare Fläche in Abhängigkeit von der DPPC/Triterpenoid-Zusammensetzung: die Geraden repräsentieren die molekularen Flächen bei ideal additivem Verhalten; die Kurven durch die Meßpunkte wurden per Hand gelegt (ooo --- für 40°C; +++ •-•-• für 10°C); lateraler Filmdruck der Isobaren war 25 dyn/cm.

DIHPC hat bei 21,3°C einen Phasenübergang. Bei den im folgenden betrachteten Temperaturen von 10°C und 40°C befindet sich DIHPC in der flüssig-kondensierten bzw. flüssig-expandierten Phase (Abb.33; Tab. 7).

Verhältnis DPPC:Triterp.	Kondensation K (Flächenzunahme negativ)						Flächenänderung ΔF zwischen 10°c und 40°C			Phasenübergang T_m			Übergangsintervall ΔT (geschätzt)		
	Cholesterin		THBH		HGL		Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL
	10°C	40°C	10°C	40°C	10°C	40°C									
mol%	Å²/Molekül						Å²/Molekül			°C			°C		
100:0							12	12	12	34,5	34,5	34,5	7	7	7
91:9	2,0	2,2	1,4	1,1	-0,2	1,1	11,7	11,1	8,1	32	30,5	27,5	12	13	17
80:20	3,6	4,8	2,1	1,8	-0,3	1,5	10	10,5	10,3	31,5	28,5	27,5	16	25	22
67:33	4,6	7,5	2,2	2,1	-0,4	1,8	5,1	6,6	7,1	33	31	23	16	28	26
50:50	4,6	8,5	1,9	2,4	-0,6	2,1	1,4	4,6	4,2	-	32	-	-	30	-
0:100							0	0	3,8						

Tab. 6: Kondensation K, Flächenänder. ΔF, Phasenübergang T_m und Übergangsintervall ΔT von DPPC/Triterpenoid-Monolayern (Luft-Wasser): alle Werte sind bei einem Filmdruck von π = 25 dyn/cm bestimmt.

Verhältnis DIHPC:Triterp.	Kondensation K (Flächenzunahme negativ)						Flächenänderung ΔF zwischen 10°C u. 40°C			Phasenübergang T_m			Übergangsintervall ΔT (geschätzt)		
	Cholesterin		THBH		HGL		Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL
	10°C	40°C	10°C	40°C	10°C	40°C									
mol%	$Å^2$/Molekül						$Å^2$/Molekül			°C			°C		
100:0							7,9	7,9	7,9	21,3	21,3	21,3	15	15	15
91:9	1,4	4,1	1,7	4,0	0,5	3,1	5,0	4,9	4,8	19	18	19	21	18	18
80:20	2,5	6,0	1,7	4,2	0,4	3,8	3,3	3,9	3,7	18,5	16	(24)	20	24	24
67:33	3,5	7,3	1,4	3,5	0	3,6	2,2	3,2	3,0	16,0	20	14	22	22	22
50:50	4,0	6,7	1,2	2,9	-0,2	3,4	1,4	2,3	2,2						
0:100							0	0	3,8						

Tab. 7: Kondensation K, Flächenänderung ΔF, Phasenübergang T_m und Übergangsintervall ΔT von DIHPC/Triterpenoid-Monolayern (Luft-Wasser): lateraler Filmdruck war π = 25 dyn/cm.

Verhältnis DAHPC:Triterp.	Kondensation K (Flächenzunahme negativ)						Flächenänderung ΔF zwischen 4°u.$40^{\circ}C$			Phasenübergang T_m			Übergangsintervall ΔT (geschätzt)		
	Cholesterin		THBH		HGL		Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL
	$4^{\circ}C$	$40^{\circ}C$	$4^{\circ}C$	$40^{\circ}C$	$4^{\circ}C$	$40^{\circ}C$									
mol%	$Å^2$/Molekül						$Å^2$/Molekül			$^{\circ}C$			$^{\circ}C$		
100:0							6,7	6,7	6,7	<0	<0	<0	>16	>16	>16
91:9	2,3	2,9	1,7	1,9	0,7	1,6	5,2	5,7	5,1	<0	<0	<0	>26	-	-
80:20	3,8	4,0	2,9	3,8	1,5	2,9	5,0	4,1	4,4	<0	<0	<0			
67:33	5,1	4,9	3,9	5,0	2,4	4,4	4,4	3,1	3,5	<0	<0	<0			
50:50	6,0	6,0	4,3	5,2	3,2	5,1	3,5	2,3	3,1	<0	<0	<0			
0:100							0	0	3,8						

Tab. 8: Kondensation K, Flächenänderung ΔF, Phasenübergang T_m und Übergangsintervall ΔT von DAHPC/Triterpenoid-Monolayern in der Luft-Wasser-Genzschicht; lateraler Filmdruch war π = 25 dyn/cm.

Verhältnis DCDPC:Triterp.	Kondensation K (Flächenzunahme negativ)						Flächenänderung ΔF zwischen 4° u. 40°C			Phasenübergang T_m			Übergangsintervall ΔT (geschätzt)		
	Cholesterin		THBH		HCL		Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL	Cholesterin	THBH	HGL
	4°C	40°C	4°C	40°C	4°C	40°C									
mol%	$Å^2$/Molekül						$Å^2$/Molekül			°C			°C		
100:0								5,3							
91:9	2,5	4,2	0,8	1,7	-0,1	1,5	3,0	3,8	3,4						
80:20	4,6	6,2	1,3	3,2	-0,6	1,4	2,5	2,1	2,8						
67:33	5,8	6,8	1,7	3,6	-1,4	1,1	2,6	1,5	2,2						
50:50	6,6	7,0	1,9	2,8	-2,3	0,6	2,2	1,5	1,5						
0:100							0	0	3,8						

Tab. 9: Kondensation K und Flächenänderung ΔF von DCDPC/Triterpenoid-Monolayern in der Luft-Wasser-Grenzschicht: lateraler Filmdruck π = 25 dyn/cm.

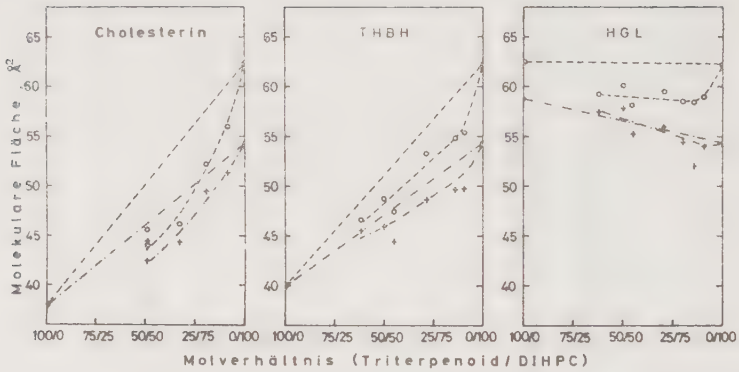


Abb. 33: Molekulare Fläche in Abhängigkeit von der DIHPC/Triterpenoid-Zusammensetzung: die Geraden repräsentieren die theoretischen molekularen Flächen bei additivem Verhalten, die Kurven durch die Meßpunkte sind per Hand gelegt (ooo --- für 40°C; +++ -•-•- für 10°C); Isobarendruck war π = 25 dyn/cm.

DAHPC hat einen Phasenübergang unter 0°C. Bei 4°C befindet sich DAHPC innerhalb des Umwandlungsbereichs, während bei 40°C das Lipid in der flüssig-expandierten Phase ist. Die Ergebnisse der DAHPC/Triterpenoid-Mischungen sind in Abb. 34 und Tab. 8 zusammengestellt.

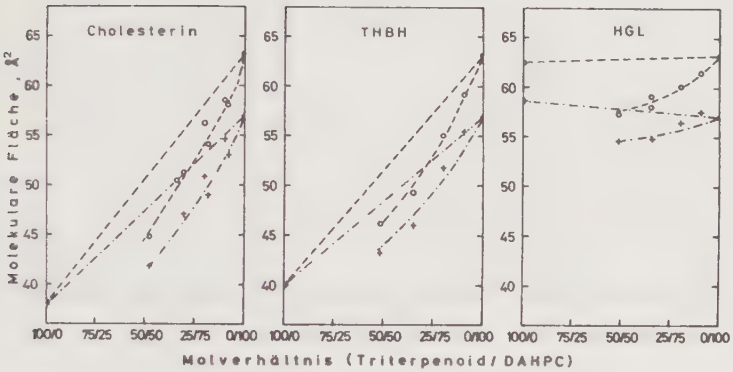


Abb. 34: Molekulare Fläche in Abhängigkeit von der DAHPC/Triterpenoidzusammensetzung: die Geraden repräsentieren die theoretischen molekularen Flächen bei additivem Verhalten; die Kurven durch die Meßpunkte wurden per Hand gelegt (ooo --- für 40°C; +++ •-•-• für 4°C); Isobarendruck war π = 25 dyn/cm.

DCDPC zeit einen kalorimetrisch gemessenen Phasenübergang bei 13,8°C. Die Isobare bei 25 dyn/cm wies keinen Phasenübergang zwischen 0° und 40°C aus. Es scheint sich bei den untersuchten Temperaturen um einen weitgehend kondensierten Film zu handeln (Abb. 35; Tab. 9).

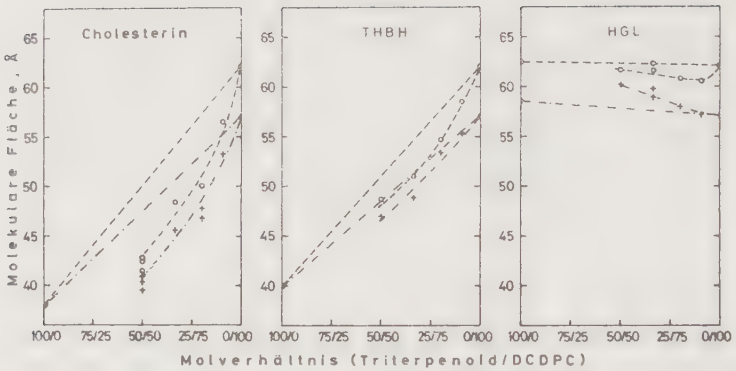


Abb. 35: Molekulare Fläche in Abhängigkeit von der DCDPC/Triterpenoid-Zusammensetzung: die Geraden repräsentieren die theoretischen molekularen Flächen bei additivem Verhalten; die Kurven durch die Meßpunkte wurden per Hand gelegt (ooo --- für 40°C; +++ -•-•- für 4°C; Isobarendruck war π = 25 dyn/cm.

3.3.4. Vergleich der PC/Triterpenoid-Mischsysteme

HGL ist von Cholesterin und THBH dadurch unterschieden, daß es zusätzlich noch eine Fettsäure besitzt. Da nach DEMEL, DE KRUYFF (1976) die Kondensation ihre Ursache in einer Restriktion der Acylketten hat, scheint eine bessere Beurteilung der Kondensation möglich, wenn man sie auf der Basis der Acylkettenkonzentration durchführt.
Abb. 36 und Abb. 37 fassen die Ergebnisse auf dieser Grundlage zusammen.

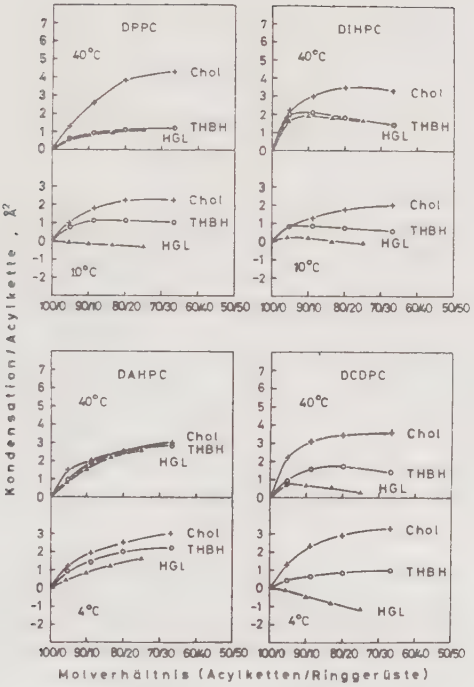


Abb. 36: Die Abhängigkeit der Kondensation von der Acylkettenkonzentration in gemischten Monolayern aus PC und Triterpenoid: Flächenzunahme ist negativ ausgewiesen; lateraler Filmdruck π = 25 dyn/cm.

Für die flüssig-expandierte Phase wird im folgenden Schema die Lipidinteraktion mit den verschiedenen kondensierenden Ringmolekülen als Prozent der größten gefundenen Kondensation ausgedrückt:

	Cholesterin	THBH	HGL
DPPC	100	28	26
DCDPC	84	42	18
DIHPC	81	49	44
DAHPC	70	65	61

Die sterische Anordnung der Moleküle unterhalb des Phasenübergangs wird vom Flächenbedarf der Kopfgruppe und der Fettsäureketten determiniert. Ist der Kopf größer als die Querschnittfläche der Acylketten, werden sie zur Optimierung der Van-der-Waals-Kräfte gegen die Membrannormale abgewinkelt (NAGLE, 1980; HAUSER et al. 1981). Nach HAUSER et al. (1981) liegt der Kopfquerschnitt von PCs zwischen 47-54 $Å^2$ und z.B. für PEs bei 40 $Å^2$. Bei einem Acylkettenquerschnitt von 20,5 $Å^2$ für gerade Ketten werden PCs im Monolayer vom Lipidkopf flächenlimitiert, mit entsprechend abgewinkelten Fettsäureketten, während PE, bei senkrechter Orientierung der Ketten, in der gesamten Längsachse annähernd gleichen Querschnitt hat. Cholesterin richtet in PC mit seinem voluminösen, hydrophoben Rest die Acylketten auf, bewirkt also eine senkrechte Orientierung, ohne daß sich die sperrigen PC-Köpfe gegenseitig behindern. Der Flächenbedarf des Lipids wird aber nach der Konformationsänderung von den Acylkettenquerschnitten bestimmt. Außerdem weisen Veränderungen im Dipolmoment auf eine adaptive Kopfgruppenumorientierung hin (CADENHEAD, MÖLLER-LANDAU, 1979; ALBRECHT et al. 1981; BLUME, unveröffentlichte Daten).

Abb. 36 zeigt für alle untersuchten Lipide bei niedrigen Temperaturen Flächenreduzierungen mit Cholesterin. Aber nur für die eindeutig flüssigkondensierten Filme von DIHPC und DPPC hat die Flächenreduzierung ihre Ursachen in der besprochenen Konformationsänderung. DAHPC ist bei $4^{o}C$ im Phasenübergangsbereich und gibt in der Flächenreduzierung die Summe der Wirkungen von Cholesterin auf die verschiedenen Phasenzustände wieder. Der bei $4^{o}C$ wahrscheinlich kondensierte Film von DCDPC zeigt zwar eine große Kondensation, deren Ursachen aber, wegen der Unklarheiten mit dem Phasenübergang, noch offen bleiben.

MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD (1979) kommen aus der Analyse von Sterol/PC-Systemen zu dem Schluß, daß die maximale Kondensation bei 41 mol% Sterol liegt. Bei dieser Konzentration sehen ALBRECHT et al. (1981) Anzeichen einer reinen Cholesterin-Phase neben einer Cholesterin/PC-Phase. Meine Werte zeigen bei 30 mol% Triterpenoid ausnahmslos nur noch geringe Abweichungen von den 50 mol%-Werten. Die Vermutung liegt nahe, daß hohe Konzentrationen nur noch eine freie Phase Cholesterin (THBH, HGL) vergrößern, zumindest aber keine weiter steigende Kondensation bewirken. Unter dieser Annahme läßt sich aus den 50 mol%-Werten eine molekulare Fläche für das Phospholipid errechnen, die ein Maß für die mittlere Wirkung auf das entsprechende Lipid ist. Insbesondere erlauben die Cholesterin-Werte unterhalb des Phasenübergangs - unter den für PCs der untersuchten Acylkettenlänge berechtigt erscheinenden Annahme von umlagerungsinvarianten Fettsäurequerschnittflächen und von gleichen Packungsdichten in beiden Konformationen (BLUME, unveröffentlichte Daten) - eine Abschätzung der Acylkettenquerschnittflächen.
Tab. 10 faßt die mittleren molekularen Flächen der in 1:1-Mischungen mit Triterpenoid kondensierten PCs zusammen.

Für DPPC wurde danach unterhalb des Phasenübergangs eine molekulare Fläche von 41 $Å^2$ bestimmt, was einem Acylkettenquerschnitt von 20,5 $Å^2$ entspricht (Tab. 10). Mit dem, bei geneigten Ketten flächenbestimmenden, Kopf von 50 $Å^2$ errechnet sich der Neigungswinkel gegen die Membrannormale nach

$$\cos \varphi = \frac{\text{Fläche der Acylkettenquerschnitte}}{\text{Kopfgruppenquerschnitt}}$$

zu $\varphi = 35^o$. Kopfgruppenquerschnitt und Acylkettenquerschnitt sind beide gut in der Literatur dokumentiert (HAUSER et al., 1981; MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979).
Nach der gleichen Abschätzung wurde die Querschnittfläche der DIHPC-Fettsäuren zu 46,5 – 47 $Å^2$ bestimmt. Dieser Wert entspricht einem Kettenquerschnitt von 23 bis 23,5 $Å^2$ / Acylkette. Mit einer Kopffläche von 54 $Å^2$ errechnet sich daraus eine Acylkettenneigung von $\varphi = 30^o$. Vergleichswerte liegen lediglich aus einer Studie über die Wirkung von Acylkettenverzweigungen in Palmitinsäure vor. WEITZEL et al. (1951a) bestimmten die molekulare Fläche von 15-Methyl-palmitinsäure mit 25 $Å^2$/Molekül. Die am Kalottenmodell ermittelten Dimensionen (4,7 x 5,0 Å) und die daraus resultierende Rechteckfläche von 23,5 $Å^2$ harmoniert eher mit dem von mir

Lipid	Triterpenoid	Flächenbedarf von PCs in 1:1-Mischungen mit Triterpenoid 4°C	10°C	40°C	Flächenänderung ΔF	Phasenübergangstemperatur T_m
		Å²/Molekül			Å²/Molekül	°C
DPPC	–	50	50	62	12	34,5
	Cholesterin		41	45	4	
	THBH		47	57,5	10,5	
	HGL		51	57,6	6,6	
DIHPC	–	54,3	54,3	62,3	7,9	21,3
	Cholesterin		46,5-47	50	3,5	
	THBH		52,2	57	4,8	
	HGL		55,3	55,5	0,2	
DAHPC	–	57		63,4	6,4	< 0
	Cholesterin	45,5		51,5	6	
	THBH	47		52,8	5,8	
	HGL	50,5		52,5	2,5	
DCDPC	–	56,7		62	5,3	–
	Cholesterin	43		46,4	3,4	
	THBH	53,5		57,0	3,5	
	HGL	61,8		60,6	-1,2	

Tab. 10: Kalkulierter Flächenbedarf von Phosphatidylcholinen in 1:1 Mischungen mit Triterpenoiden: lateraler Druck π = 25 dyn/cm

gesättigten Acylketten verursacht. Eine schwächere Neigung, verglichen mit DPPC, scheint bei voluminöseren Acylketten plausibel.

Für DAPC kann wegen des Phasenübergangs unter 0°C die obige Absorption nicht erfolgen. Allerdings ergibt sich aus dem Vergleich der kondensierter Moleküle bei 40°C, daß DAPC einen 1,5 $Å^2$ größeren Flächenbedarf als DPPC haben könnte, also etwa bei 24,5 $Å^2$ liegt. Bestätigt wird dieser Schätzwert wieder von WEITZEL et al. (1981a), die für 14-Methyl-palmitinsäure eine molekulare Fläche von 25,5 $Å^2$ ermittelten, mithin 1,5 $Å^2$ über der von 16-Methyl-palmitinsäure. Die Kopfgruppenmenge ist aus der früheren Daten nicht zugänglich.

DSDPC weist bei 4° und 40°C mit 43 $Å^2$ und 46,5 $Å^2$ erstaunlich niedrige Flächen pro Molekül aus. Die aus den Kalottendimensionen errechnete Rechteckfläche von 33 $Å^2$ pro Acylkette steht im Widerspruch zu der geringen Molekülflächen.
Dagegen können diese Absorptionen durch nicht additive Konformationsanlagerungen werden, also bei gleichzeitiger Querschnittvergrößerung der Acylketten. Die tatsächlichen Querschnitt würden sich dann zu kleineren Werten verschieben. Die wenigen Literaturhinweise geben aber bisher keinen Anlaß zu dieser Befürchtung (z.B. WEITZEL et al., 1981a).

Die zum Vergleich der Kondensationen eigentlich notwendigen absoluten Flächenbestimmungen waren nur für die Phospholipide und Cholesterins gegeben. Die Effekte von TWEEN und HGL weisen, wie noch zu diskutieren sein wird, Ungenauigkeiten auf, die aber trotzdem quantitative Beurteilungen erlauben.

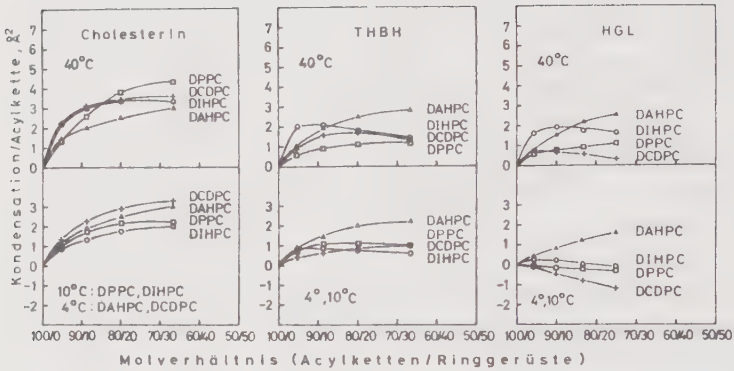


Abb. 37: Die kondensierende Wirkung pro Acylkette von Cholesterin, THBH und HGL auf PCs: Flächenzunahme ist negativ ausgewiesen; Filmdruck π = 25 dyn/cm.

Oberhalb des Phasenübergangs beschreibt auf der Basis der maximalen Kondensation die folgende Matrix die kondensierende Potenz der untersuchten Triterpenoide:

Cholesterin:	DPPC	>	DCDPC	=	DIHPC	>	DAHPC
	⋛		∨		∨		‖
THBH:	DPPC	<	DCDPC	<	DIHPC	<	DAHPC
	‖		∨		‖		‖
HGL:	DPPC	∼	DCDPC	<	DIHPC	<	DAHPC

Unterhalb des Phasenübergangs ist die Flächenreduzierung durch THBH in DPPC, DIHPC und DCDPC kleiner als die von Cholesterin; HGL mischt sich additiv (DPPC, DIHPC) bzw. unter Flächenexpansion (DCDPC). In der

Reihenfolge Cholesterin > THBH > HGL reduzieren die untersuchten Triterpenoide die molekulare Fläche des bei 4°C nur teilweise kondensierten DAHPCs.
In beiden physikalischen Zuständen tritt für Cholesterin, mit Ausnahme von DAHPC, eine Effektsättigung zwischen 30 und 50 mol% auf. Die maximalen Kondensationen von THBH und HGL lagen ebenfalls, mit Ausnahme von DAHPC, in allen Lipiden bei 20 mol% Hopanoid. DAHPC zeigt mit allen Triterpenoiden nur angenähert diese Mischgesetzmäßigkeit.

3.3.5. Diskussion der Monolayerergebnisse

Die Untersuchungen am Monolayer sind von besonderem Interesse, da er nach dem Membranmodell von SINGER, NICOLSON (1972) einen "halben Bilayer" repräsentiert und nach ALBRECHT et al. (1981) das am besten definierte Membranmodell darstellt. Die Frage, ob die Monolayerverhältnisse wirklich auf den Bilayer übertragbar sind, stellt sich trotzdem, denn zumindest die physikalischen Bedingungen im Bereich der hydrophoben Acylketten könnten im Mono- und Bilayer verschieden sein, etwa infolge von Interaktionen zwischen den Monolayerhälften des Bilayers.

Lipide sind im Monolayer in einem flüssig-kondensierten oder einem flüssig-expandierten Zustand, wobei der Übergang von einem in den anderen Zustand von der Temperatur, dem Druck, dem Ionenmilieu und dem pH-Wert der Subphase abhängen (CHAPMAN et al., 1966; PHILLIPS, CHAPMAN, 1968; VILLALONGA, 1968; DEMEL et al., 1972c; HAYASHI et al., 1973a,b; TRÄUBLE et al., 1974; ALBRECHT et al., 1978; BLUME, 1979; ALBRECHT et al., 1981; GAINES, 1966; SHAH, 1972).
Der Phasenübergang aus dem flüssig-kondensierten in den flüssig-expandierten Zustand kann bei entsprechendem Druck dem Phasenübergang im Bilayer gleich werden und damit werden beide Phasenübergänge vergleichbar (NAGLE, 1980). Ausgehend von verschiedenen thermodynamischen Daten wurden in den letzten Jahren Filmdrücke von π= 12 dyn/cm bis π = 50 dyn/cm vorgeschlagen, bei denen Mono- und Bilayerverhältnisse gleich sein sollen (PHILLIPS et al., 1969; HUI et al., 1975; NAGLE, 1976; SACKMANN, 1982; BLUME, 1979). Zudem wurde mit Hilfe von Elektronenbeugung im flüssig-kondensierten Zustand von Lipiden auch im Monolayer eine hexagonale Kristallsymmetrie, wie sie vom Gelzustand des Bilayers gut bekannt ist,

nachgewiesen (SACKMANN, 1982). Trotz der ungelösten Frage, bei welchem Filmdruck Mono- und Bilayerverhältnisse gleich sind (SACKMANN, 1982), kommt NAGLE (1980) aus der Tatsache eines Phasenübergangs in beiden Systemen, mit in etwa gleicher Übergangstemperatur und gleichem Übergangsdruck, zu dem Fazit, daß im Bilayer keine spezifischen Interaktionen zwischen den beiden Monolayern existieren (vorausgesetzt, die Acylketten sind annähernd gleich lang). Zusammenfassend erweist sich damit, daß der Monolayer ein wesentliches Instrument des Membranstudiums ist.

Eine Reihe von Befunden und thermodynamischen Vergleichen an Mono- und Bilayern sprechen dafür, daß ein mittlerer lateraler Filmdruck von π = 30 dyn/cm am ehesten die Bilayerverhältnisse simuliert (JANIAK et al., 1976; INOKO, MITSUI, 1978; JÄHNIG et al., 1979; DEMEL et al., 1975; NEHER, EIBL, 1977; BLUME, 1979). Von dieser Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit ausgegangen, wegen der teilweisen Instabilität der Monolayerfilme aber ein durchgängiger Filmdruck von π = 25 dyn/cm gewählt. Wie aus den Isothermen der Lipidfilme ersichtlich, liegt die daraus resultierende Abweichung gegen den 30 dyn/cm-Wert unter 10%.

In einer ins Philosophische reichenden Kritik haben GERSHFELD und seine Mitarbeiter Monolayerergebnisse als an metastabilen Filmen gewonnen und damit als zeitabhängig besprochen (GERSHFELD, 1976; TAJIMA, GERSHFELD, 1978; GERSHFELD, 1978; GERSHFELD, TAJIMA, 1977; GERSHFELD, 1981). Die Autoren diskutieren eine Abhängigkeit des physikalischen Verhaltens der Lipidfilme von der Vorgeschichte der Filme (Lösungsmittel, Äquilibrierungszeiten für Druck und Temperatur) und eine Cholesterin/PC-Komplexbildung, die zeitabhängig zu einer Entmischung der Filme führen soll. CADENHEAD et al. (1976) konnten zeigen, daß Cholesterin/PC-Mischungen nur bei einem Filmdruck von 0 dyn/cm instabil waren, während bei höheren Drücken der Film sich nicht über 16 Stunden änderte; die von mir gefundene Reproduzierbarkeit von reinen Lipidfilmen auch mit leicht veränderter Vorgeschichte und in Wiederholungsmessungen, die einige Stunden auseinanderlagen, sprechen dafür, daß der etwa vorhandene metastabile Zustand ausreichend zeitlich und physikalisch definiert ist, um sinnvoll an ihm zu messen. Zu diesem Urteil kommt auch NAGLE (1980) in einer kritischen Würdigung der von Gershfeld vorgetragenen Monolayerkritik.

3.3.5.1. Triterpenoidfilme

Nach DEMEL et al. (1972a) ist Cholesterin mit der OH-Gruppe am C 3 des A-Kohlenwasserstoffringes in der Luft-Wasser-Grenzschicht in das Wasser orientiert (Abb. 14), dem schließt sich der hydrophobe Bereich mit dem endständigen Isooctanarm an. THBH hat am C 29 des Hopangerüstes einen Pentanseitenarm (Abb. 15), der mit seinen 4 endständigen OH-Gruppen in die Wasserphase reicht. Die Inserierung des Hopangerüsts am Ende des hydrophoben Bereichs stellt also, verglichen mit Cholesterin, eine umgekehrte Orientierung dar. Diplopterol trägt nur eine OH-Gruppe am C 22 des Hopangerüsts (Abb. 16), die nur eine C-C Bindungslänge vom Kohlenwasserstoffgerüst des Hopans entfernt ist. Die Lage des hydrophoben Ringgerüstes ähnelt demnach mehr der des Cholesterins, sein hydrophober Bereich ist aber kürzer als der von Cholesterin und THBH. Im HGL ist an die endständige OH-Gruppe des THBHs glycosidisch ein Glucosamin gebunden, dessen Aminogruppe eine weitere Fettsäure trägt (Abb. 17). Aufgrund des physikalischen Charakters sollten sich Acylkette und Hopangerüst parallel orientieren. Das Molekül ist im hydrophilen Kopf und im hydrophoben Bereich wesentlich erweitert. Die Orientierung des Hopangerüstes entspricht der von THBH.
Cholesterin zeigte im Monolayer den von PETHICA (1955) beschriebenen flüssig-kondensierten Film geringer Kompressibilität. Man folgert daraus, daß die Moleküle senkrecht in der Luft-Wasser-Grenzschicht orientiert sind (PETHICA, 1955; DEMEL et al., 1972a). THBH und Diplopterol bilden flüssig-kondensierte Filme geringer Kompressibilität. Ihr Filmverhalten spricht ebenfalls für weitgehend senkrecht orientierte Moleküle. HGL bildet einen flüssig-kondensierten Film mit geringer Temperaturabhängigkeit und etwas erhöhter Kompressibilität. Dieser Befund sollte auf den druck- und temperaturabhängigen Flächenbedarf der Acylkette bei senkrecht orientiertem Hopanoidanteil zurückgehen (KANNENBERG, 1979).

Die molekulare Fläche für Cholesterin wurde mit 38 $Å^2$/Molekül bestimmt und entspricht damit gut den mit 36,7 - 39,5 $Å^2$ in der Literatur angegebenen Werten (DEMEL, DE KRUYFF, 1976).
Die molekularen Flächen von THBH und Diplopterol wurden auf 40 $Å^2$ normiert, die von HGL auf 60 $Å^2$. Die Normierungen sind willkürlich, sollten aber im Falle von THBH und Diplopterol keine allzu großen Fehler

beinhalten; die Molekülgröße liegt zwischen der des Cholesterins und der des um eine CH_3-Gruppe breiteren α-Amyrins, für das eine molekulare Fläche von 44 $Å^2$/Molekül gemessen wurde (CADENHEAD, PHILLIPS, 1967). Nach den Kalottendimensionen zu urteilen, könnte die Normierung von HGL erheblich zu niedrig sein. Da aber weder die genaue Molekülkonformation bekannt ist, noch das verwendete Präparat chemisch definiert war (Fettsäuren mit Verzweigung und Cyclohexanring), wurde die Normierung beibehalten.
Die von mir über Gewichtseinwaage bestimmten absoluten Flächen für THBH und HGL (THBH: 35 $Å^2$/Molekül; HGL 45 $Å^2$/Molekül) sind nach den Molekül-dimensionen zu niedrig. Eine Erklärung für die Abweichung könnte in der Annahme von Restlösungsmitteln in den Präparaten liegen, was bei den großen polaren Köpfen nicht unwahrscheinlich wäre. Zum Beispiel bringt die Anwesenheit von 2 Molekülen Methanol eine Abweichung von 11% von der wahren Molekülfläche. Die mit diesem Fehleransatz aus den normierten Flächen errechneten Flächen stimmen erstaunlich gut mit den gemessenen Werten überein. Der Versuch einer quantitativen Hopanoidbestimmung über vicinale OH-Gruppen (KATES, 1972) scheiterte an der Nichtreproduzierbarkeit. Vermutlich infolge von freigesetzten, OH-Gruppen tragenden kurzen C-Ketten brachten die Bestimmungen Hopangehalte, aus denen sich das Hopanoidgerüst mit 30 - 35 $Å^2$/Molekül errechnete, allesamt Werte, die nach den obigen Ausführungen zu niedrig liegen.

Nach DEMEL et al. (1972a) scheinen die die molekulare Packung von Sterolen bedingenden zwischenmolekularen Kräfte wenig von Veränderungen in der Seitenkette abzuhängen, essentiell sind jedoch die planare Struktur und die OH-Gruppe in 3 Stellung des A-Ringes. Hopanoide haben ihre molekularen Entsprechungen in den OH-Gruppen des Seitenarms und dem hydrophoben Bereich mit dem planaren Hopangerüst.

Die aus den Steigungen der Isothermen geschätzten Kompressibilitäten der Lipidfilme zeigen für Cholesterin den geringsten Wert, für Diplopterol etwa das Doppelte, für THBH das 3,5-fache und für HGL etwa das Zehnfache des Cholesterin-Wertes.
CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU (1979) kommen in der Analyse kondensierter Monolayerisothermen verschiedener Sterole zu dem Schluß, daß die geringe

Kompressibilität mehr durch sterische Faktoren determiniert wird als durch über größere Distanzen wirkende Ladungseffekte. Eine der sterischen Besonderheiten von Cholesterin ist die vollkommen methylgruppenfreie α-Seite des Ringgerüstes. Die in der 3 β - Konfiguration an der Spitze der durch die Cholesterin-Ringe aufgespannten Ebene inserierte OH-Gruppe erlaubt bei senkrechter Orientierung des Moleküls optimale hydrophobe Wechselwirkungen bei einer gleichzeitig energetisch günstigen Lage der OH-Gruppe (CADENHEAD, PHILLIPS, 1967). Wie in Abb. 14 und 15 ersichtlich, haben THBH und HGL wesentlich vergrößerte hydrophile Molekülbereiche und entsprechend einen stärker ins hydrophile verschobenen Molekülcharakter. Die beiden Moleküle lassen infolge von Methylgruppengestörten Ringebenen behinderte hydrophobe Wechselwirkungen erwarten; daneben sind bei der starken Inserierung im hydrophilen Bereich auch Molekülschwingungen aus der Senkrechten denkbar, die energetisch nicht stark behindert sein dürften. Beide Effekte sollten die Ursache der erhöhten Kompressibilität von THBH ausmachen. Im Falle von HGL kommen auch noch die druck- und temperaturabhängigen Konformationsänderungen der Acylkette hinzu, die die Kompressibilität des Gesamtmoleküls weiter erhöht. Für 3 α - Cholesterin postulieren CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU (1979) aus energetischen Gründen eine gegen die Membrannormale geneigte Orientierung bei gleich guten hydrophoben Wechselwirkungen. Wie am Kalottenmodell für Diplopterol ersichtlich wurde, liegt die Hydroxylgruppe am C 22 des Moleküls nicht in der durch das Ringgerüst ausgezeichneten Ebene, sondern ist ihr seitlich aufgesetzt. Danach sollte sich die energetisch optimale Hydratisierung auch erst im leicht geneigten Molekül einstellen. Die etwas erhöhte Kompressibilität in der ersten einer Serie von Isothermen könnte ihre Ursache in einer optimalen Packung der Ringgerüste haben, die die Moleküle aufrichtet, aber auch die Hydratisierung verschlechtert. Hydrophobe Van-der-Waals-Kräfte wären dann für eine gewisse Stabilität der dichten Packung verantwortlich, die sich in der verminderten Kompressiblität der folgenden Läufe äußert. Nach dieser Interpretation hat die geringe Thermo- und Druckstabilität des Diplopterolfilmes ihre Ursache in den methylgruppengestörten hydrophoben Wechselwirkungen, aber auch in der zwangsläufig schlechteren Hydratisierung in der Interphase. Gestützt wird diese Interpretation auch durch Befunde an oxidierten Isomeren von Cholesterin, die eine geneigte Orientierung verursachen, unter Erhöhung der Kompressibilität (CADENHEAD et al.

1982).Wichtig scheint auch der Hinweis, daß die am reinen Lipidfilm aus physikochemischen Ursachen notwendige geneigte Orientierung nicht mit der Konformation in gemischten Filmen und der Bilayerkonformation übereinstimmen muß (CADENHEAD, MÖLLER-LANDAU, 1979).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle vier Molekültypen flüssig-kondensierte Monolayer bilden mit weitgehend senkrechter Orientierung. Diplopterol scheint aufgrund der OH-Gruppenlage nicht eine ähnlich hohe Druck- und Temperaturstabilität wie THBH / Cholesterin / HGL zu haben, während HGL eine geringe Temperaturabhängigkeit durch Acylketten am glycosidisch gebundenen Glucosamin zeigt.

3.3.5.2. PC-Filme

Der Phasenzustand eines Lipids und die Charakteristika des Phasenübergangs sind vom polaren Kopf und vom hydrophoben Teil des Moleküls abhängig. Bei gleicher Lipidkopfgruppe wird das Verhalten, bei definierten Bedingungen, wesentlich vom hydrophoben Teil, also von den Acylketten bestimmt (GERSHFELD, 1974; DEMEL, 1968; CORNWELL, PATIL, 1977).

Die untersuchten Lipide haben nicht nur den gleichen hydrophilen Kopf (3-Phosphatidylcholin), sondern im Falle von DPPC, DIHPC und DAHPC mit 37,7 Å gleichlange Fettsäuren und im Falle von DCDPC eine nur um 0,8 Å kürzere Acylkette (Tab. 1). Die Unterschiede in den Monolayerdaten sollten daher in erster Linie durch die sterischen Besonderheiten der Acylketten der untersuchten Lipide bedingt sein.

Durch die Einführung einer oder zweier Fettsäuren mit Doppelbindungen wird der Phasenübergang gegenüber dem gesättigten homologen Lipid erniedrigt und bei gegebener Temperatur die molekulare Fläche erhöht. Die gleiche Wirkung auf Phasenübergang und molekulare Fläche hat eine Verkürzung der Acylketten (DEMEL et al., 1972c; DEMEL, 1974; JOOS, DEMEL, 1969; CHAPMAN et al., 1969; GHOSH, TINOCO, 1972; DEMEL, DE KRUYFF, 1976).

Im Ergebnisteil wurde dargestellt, daß die iso- bzw. anteiso-Verzweigung von DIHPC und DAHPC verglichen mit DPPC den Flächenbedarf in der flüssig-kondensierten Phase erhöht und die Phasenübergangstemperatur absenkt.

Überraschend bleibt, daß nur DAHPC einen geringfügig größeren Flächenbedarf in der flüssig-expandierten Phase hat. Die im Bilayer gut bewiesene Tatsache der geringeren Ordnung am Acylkettenende (SEELIG, BROWNING, 1978; SEELIG, SEELIG, 1974) scheint auch auf den Monolayer übertragbar (SCOTT, WOOD-HI CHENG, 1977). Demnach toleriert die Unordnung am Acylkettenende der flüssig-expandierten Phase die iso-Verzweigung ohne Flächenzunahme, während die anteiso-Verzweigung bereits eine geringe Flächenzunahme bewirkt. Tendenziell bestätigt wird dieser Befund durch die Arbeiten von WEITZEL et al. (1951a, b) und BARTON, GUNSTONE (1975), die die Wirkungen von Methylverzweigungen in Palmitin- und Stearinsäure bzw. den Einfluß von Doppelbindungen auf den Phasenübergang von PC mit C_{18} Kettenlänge studierten. Beide Arbeiten finden einen zum Kettenende hin gesetzmäßig abnehmenden Einfluß.
Anders jedoch in der geordneten, flüssig-kondensierten Phase. Hier wirken iso- und anteiso-Verzweigung einer optimalen Packung entgegen und vergrößern die Abstände zwischen den Acylketten. Da die London-Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Acylketten mit der sechsten Potenz des Abstands abnehmen (DAVENPORT, 1971), wird verständlich,warum die Verzweigungen, über die herabgesetzten, hydrophoben Wechselwirkungen, so dramatisch den Phasenübergang beeinflussen (KANNENBERG et al. 1983). Qualitativ wirken damit Verzweigungen wie Doppelbindungen oder Kettenverkürzungen.

Die Monolayertechnik erlaubt nur die Beurteilung der Wirkung von strukturellen Veränderungen auf die laterale Packung der Molekule (LONDON et al., 1974; LUNDBERG, 1982). Nicht unmittelbar zugänglich ist aus Monolayerdaten die Fluidität der untersuchten Membranen. Gesichert ist, daß ungesättigte Fettsäuren in Phospholipiden die Fludität der abgeleiteten Modellmembranen gegen Vergleichssysteme erhöhen (CRONAN, GELMANN, 1975). Im Monolayer werden die Wirkungen der Doppelbindung u.a. durch größeren Flächenbedarf sichtbar (z.B. DEMEL, 1974).
Vermuten läßt sich daher, da DIHPC in der flüssig-expandierten Phase keinen erhöhten Flächenbedarf gegen DPPC hat, daß die Isoverzweigung keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Fludität hat. Entsprechend wäre für DAHPC eine Erhöhung der Membranfluidität zu erwarten.

DCDPC trägt am Acylkettenende einen 5,2 x 6,5 Å (Tab.1) großen starren Cyclohexanring. Von allen untersuchten Phosphilipden besitzt DCDPC die voluminöseste Endgruppe an den Acylketten. Umso erstaunlicher ist die

Tatsache, daß der Flächenbedarf bei 40°C nicht größer als der von DPPC ist. Nach den Überlegungen im Vorabschnitt wäre ein Phasenübergang unter dem von DAHPC zu erwarten. Der kalorimetrisch bestimmte Phasenübergang bei 13,8°C ist daher eine große Überraschung. Der erwartete, zu niedrigeren Temperaturen versetzte Phasenübergang im Monolayer konnte nicht gefunden werden. Die Isothermen bei 15 bis 22°C scheinen flüssig-expandierte Filme, die bei 1°C einen flüssig-kondensierten Film auszuweisen. Vergleicht man die temperaturabhängige Isothermenschar etwa von DPPC (z.B. HUI et al., 1975) mit den Isothermen von DCDPC, erwartet man zwischen diesen Kurven eine Schar von Isothermen, die, wenn auch noch so undeutlich, einen Phasenübergang zeigen sollten, der dann aber auch in diesem Temperaturintervall in den Isobaren sichtbar werden sollte. Deren Flächenbedarf wächst nur langsam mit der Temperatur ohne Phasenübergang. Der Flächenbedarf bei 4°C lag 7 $Å^2$ über dem von DPPC.

Da Lipide mit endständigen Ringen an den Acylketten im Monolayer noch nicht untersucht wurden und aus anderen Methoden nur sehr wenig Daten vorliegen, fällt die Interpretation schwer und ist notwendig spekulativ.

I. Fall: Aus den großen Flächen bei niedrigen Temperaturen könnte man auf einen flüssig-expandierten Film schließen. Unverständlich ist dann der Phasenübergang im Kalorimeter und die flüssig-kondensierte Isotherme bei 1°C mit geringer Kompressibilität.

II. Fall: Es liegt ein flüssig-kondensierter Film vor, der nur langsam und kontinuierlich mit der Temperatur seine Packungsdichte verliert und auch bei hohen Temperaturen einen höheren Ordnungsgrad beibehält. Die große molekulare Fläche wäre durch die Cyclohexanringe bedingt. Dafür sprechen die geringere Kompressibilität der 22°C Isotherme verglichen mit den anderen Phospholipiden die Abwesenheit eines Phasenübergangs in den Isobaren und die extrem niedrige Flächenänderung zwischen 1 und 40°C (2 $Å^2$/Molekül bei 35 dyn/cm). Dagegen spricht der Phasenübergang bei 13,8° C aus den Kalorimetermessungen.

In der all-trans-Konfiguration konnte am Kalottenmodell von DCDPC gezeigt werden, daß die Cyclohexanringe an den Acylketten bei paralleler Ausrichtung teilweise übereinander stehen können. Diese Konformation würde die hydrophoben Wechselwirkungen optimieren, scheint also energetisch günstig. Mit zunehmender Temperatur werden Molekülschwingungen

den Acylkettenabstand aufweichen, aber denkbar ist, daß die voluminösen Cyclohexangruppen die Acylketten kinetisch so stark hemmen und in ihrer Lage fixieren, daß nur partiell die Ordnung mit der Temperatur verloren geht. In diese Richtung zeigen auch die schon erwähnten Kompressibilitäten der Lipidfilme. Nach diesem Modell wäre auch der Phasenübergang im Kalorimeter als ein später noch genauer zu definierendes Bilayerphänomen interpretierbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Einführung einer iso- oder anteiso-Verzweigung in ein PC der Kettenlänge $C_{16:0}$ die Packungsdichte und die attraktiven Kräfte so beeinflußt, daß der flüssig-expandierte Bereich zu niedrigeren Temperaturen verschoben wird. Die Einführung eines endständigen Cyclohexanringes steht nicht in Kontinuität zu den sterischen Effekten der Verzweigung. Attraktive Kräfte zwischen den Ringen der Acylketten selbst oder/und gegenseitige kinetische Behinderungen könnten einen höheren Ordnungsgrad am Acylkettenende bewirken und damit membranverfestigend wirken.

3.3.5.3. PC/Triterpenoid-Mischungen

Mischungen aus Lipid und Cholesterin im Monolayer haben einen Flächenbedarf, der von den additiv zu erwartenden Werten abweicht. Ein geringerer Flächenbedarf wird als Kondesation oder "condensing-effect" bezeichnet (LEATHES, 1925; DE BERNARD, 1958; DERVICHIAN, 1958; SHAH, SCHULMAN, 1967; PHILLIPS, 1972; HUI et al., 1975; CADENHEAD, PHILLIPS, 1968; CHAPMAN et al., 1969; TINOCO, MCINTOSH, 1970; DEMEL et al., 1972c; DEMEL et al., 1967; GHOSH, TINOCO, 1972).
Die Größe der Kondensation ist vom physikalischen Zustand des Films abhängig, also von Druck und Temperatur und dem Lipid selbst. Der stärkste kondensierende Effekt auf ein Lipid wurde im Phasenübergang gefunden (CHAPMAN et al., 1966; CADENHEAD, PHILLIPS, 1968). Die Druckabhängigkeit der Kondensation ist lipidsortenspezifisch und wird in der Regel mit steigenden Filmdrücken kleiner (z.B. EVANS, TINOCO, 1978).

Obwohl sich eine große Zahl von Untersuchungen mit dem kondensierenden Effekt von Cholesterin auf Lipide beschäftigt, werden die physiko-chemischen Ursachen immer noch nicht richtig verstanden. Klar scheint, daß

Cholesterin im Mono- und im Bilayer gleichermaßen kondensiert (zusammenfassend DEMEL, DE KRUYFF, 1976; NES, HEFTMANN, 1981). Die Cholesterin-Orientierung in DPPC parallel zu den Fettsäureketten ist in Mono- und in Bilayer gleich(HEMMINGA, BERENDSEN, 1972; CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU, 1979). Der kondensierende Effekt scheint hauptsächlich von den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Lipidacylketten und dem Cholesterin-Gerüst auszugehen; wenig oder gar keinen Einfluß haben Wechselwirkungen zwischen der OH-Gruppe und den Lipidkopfgruppen (DEMEL, DE KRUYFF, 1976; MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979). Die Wirkung von Cholesterin auf Lipide wird als Restriktion der Acylketten in Packung und Beweglichkeit, bei konstantem Cholesterin-Flächenbedarf, beschrieben (CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU, 1979). Bilayerstudien legen den Schluß nahe, daß die Ordnung hauptsächlich der ersten 10 C-Atome erhöht wird, während das Acylkettenende eine erhöhte Freiheit für Konformationsänderungen besitzt (ENGELMANN, ROTHMANN, 1972; HUANG, 1977; DEMEL, DE KRUYFF, 1976).

Kondensierende Effekte wurden außer für Cholesterin für eine ganze Reihe verwandter Sterole beschrieben (DEMEL et al., 1972a;GHOSH, TINICO, 1972; DE KRUYFF et al., 1972; CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU, 1979). Fehlende kondensierende Eigenschaften werden ihren sterischen Eigenschaften oder mangelnder Löslichkeit im Lipidfilm zugeschrieben (DEMEL, DE KRUYFF, 1976; DEMEL et al., 1972a).

Cholesterin/PC-Interaktionen

Der überwiegende Teil der Studien über Lipidinteraktion beschäftigt sich mit dem Einfluß der Lipidkopfgruppe, der Acylkettenlänge und der Wirkung von Doppelbindungen in den Fettsäureketten (PETHICA, 1955; DEMEL et al., 1972c;JOOS, DEMEL, 1969; GHOSH, TINOCO, 1972; GHOSH et al., 1973; CHAPMAN et al., 1969; EVANS, TINOCO, 1978; DEMEL, DE KRUYFF, 1976). Vergleichbare Untersuchungen über den Einfluß von Verzweigungen und Ringsystemen auf die Lipid-Interaktion im Monolayer liegen nicht vor.

In der flüssig-expandierten Phase wurde die größte Kondensation mit DPPC gefunden. In DIHPC und DCDPC bewirkte Cholesterin etwa 80% der maximalen Kondensation und in DAHPC nur noch zwei Drittel. Aus der Sicht des Lipidflächenbedarfs bedeutet dies, daß DAHPC die geringste Packungsdichte, somit den größten Flächenbedarf hat (Tab. 10).

Die schon für die reinen Systeme diskutierte Tendenz setzt sich demnach auch in der Interaktion mit Cholesterin fort. Bei dem geringen Einfluß des Lipidkopfes auf die Cholesterin-Interaktion hängt die Kondensation, mithin die Packungsdichte hauptsächlich von den hydrophoben Wechselwirkungen ab. Ein Schluß, wie ihn auch DEMEL, DE KRUYFF (1976) aus der Abhängigkeit der Kondensation von der Acylkettenlänge und den Doppelbindungen gezogen haben. Diese waren mithin für DAHPC am schlechtesten, für DIHPC etwas besser und für DPPC am besten. Nicht ganz stimmig läßt sich DCDPC in diese Reihe einpassen. Es trägt die voluminöseste Endgruppe, hat aber nur die Kondensation von DIHPC und liegt in der Packungsdichte sogar erheblich näher an DPPC als an DIHPC (Tab. 10).

Cholesterin bewirkt in geradkettigen PCs im kondensierten Zustand eine Konformationsänderung der Acylketten von abgewinkelt (gegen die Membrannormale) zu einer senkrechten Orientierung. Aufgrund dieses Effektes kondensiert Cholesterin auch unterhalb von T_m (ALBRECHT et al., 1981; KANNENBERG et al.,1983). Die Flächenreduzierung ist kettenlängenabhängig, da für kürzere Acylketten ($\leq C_{14:0}$) sich Konformationsänderung und Querschnittvergrößerung der Fettsäureketten überlagern (BLUME, persönliche Mitteilung). DPPC lagert sich ohne Querschnittvergrößerung der Acylketten um (BLUME, unveröffentlichte Daten). Die Symmetrie der Ergebnisse von DIHPC und DAHPC mit Cholesterin / THBH / HGL scheinen den gleichen Schluß für diese beiden Systeme zu erlauben.
Die für DPPC unter diesen Annahmen kalkulierten Flächen von 20,5 $Å^2$ für die Acylkette und 50 $Å^2$ für den Kopf entsprechen den Literaturwerten (MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979; HAUSER et al., 1981). Die sich daraus errechnende Neigung gegen die Membrannormale von 35^o in flüssig-kondensiertem Zustand deutet auf hexagonale Packung hin (JANIAK et al., 1979; LADBROOKE et al., 1968), die im Monolayer bereits mit Elektronenbeugung nachgewiesen ist (SACKMANN, 1982). Für DIHPC errechnet sich der Acylkettenquerschnitt zu 23 - 23,5 $Å^2$ mit einem Neigungswinkel von 30^o gegen die Membrannormale. Auch dieses Lipid könnte hexagonal gepackt sein. Interessanterweise scheint der Lipidkopf eine adaptive Konformationsänderung zu einem 4 $Å^2$ größeren Querschnitt (verglichen mit DPPC) durchzumachen.

[illegible]

In der flüssig-expandierten Phase wirken THBH und HGL auf der Basis der Acylkettenanalyse in DPPC / DIMPC / DAMPC gleich (Abb. 37). Die maximale Kondensation beträgt in DPPC etwa ein Drittel der von Cholesterin, in DIMPC zwei Drittel und in DAMPC ist die Wirkung der Triterpenoide gleich.
Ein Problem ergibt sich aus den normierten Hopanoidmolekülflächen. Im Ge- [illegible] ner aus diesem Grund nur relativen Charakter. Eine Abschätzung des Problems ergab, daß die relativen Kondensationen mit den absoluten Kondensationen nach K = c · K' zusammenhängen.
Dabei bedeutet K = absolute Kondensation, K' = relative Kondensation und [illegible] der jeweiligen Messung auf der Monolayer (KANNENBERG, 1979). Da die mo- [illegible] nur einen geringen Fehler und kann vernachlässigt werden. Anders liegt das Problem bei HGL. Mit einer voluminösen ω-Cyclohexanfettsäure wurden [illegible] Molekül gemessen. Die zugrunde liegende relative Lipidkonzentration für die Normierung müßte demnach um den Faktor 0,67 zu kleineren Werten korrigiert werden. Der größte Fehler ist in meinen Messungen in den 1:1-Messungen zu erwarten. Gefundene relative Effekte würden sich bei diesem immensen Fehler um den Faktor 1,2 zu größeren Kondensationen/Expansionen korrigieren. Die denkbaren Korrekturen machen demnach die Effekte größer und nicht kleiner. Die in der Arbeit vorgenommenen Quantifizierungen und Vergleiche schienen danach a) wegen des geringen Fehlers von THBH und b) wegen der HGL-Fehlerkorrektur zu größeren Kondensationen/Expansionen erlaubt. Im Falle von HGL sollten die Aussagen, zumindest der Tendenz nach, zutreffen.

Die Wirkung von Cholesterin auf DPPC beruht in einer Erhöhung des Ordnungsgrades der ersten 10 Acalkettenatome (ENGELMANN, ROTHMANN, 1972; HUANG, 1977; JAIN, 1975; JOOS, DEMEL, 1969; DARKE et.al.,1972; DEMEL, DE KRUYFF, 1976). Aus der wesentlich geringeren Kondensation von THBH und HGL mit DPPC darf man wohl schließen, daß die schlechtere Interaktion im Bereich dieser Acylkettenhälfte für die Effekte verantwortlich ist. Die Orientierung von THBH/HGL in der Membran bedingt, daß im

Anschluß an den hydrophilen Bereich der Moleküle nicht wie am Cholesterin-Molekül das stark interagierende Ringgerüst inseriert ist, sondern ein etwa 4 Å langer, beweglicher Kohlenwasserstoffarm und dann erst das Hopanoidgerüst folgt. Dadurch bedingte, schlechtere Van-der-Waals-Interaktionen im Bereich der ersten 5-7 Acylkettenatome zusammen mit den sterischen Behinderungen der hydrophoben Wechselwirkungen durch die Methylgruppen zu beiden Seiten des Hopanoidgerüstes, könnten die Ursache für die schlechtere Interaktion sein. Allerdings sollte die zunehmende Kondensation von DPPC über DiMPC zu DAMPC ihre Ursache in zunehmend verbesserter molekularer Interaktion haben. Da die beiden verzweigten Lipide nur am Acylkettenende gegen DPPC verändert sind, legen die Befunde eine Verbesserung der Molekülinteraktion in diesem Bereich nahe. Ein Befund, der gut mit dem tiefer als das Steroidgerüst in die Membran reichenden Hopanoidgerüst harmoniert. Es zeichnet sich also der prinzipielle Unterschied ab, daß Cholesterin in erster Linie auf die zum Glycerinrückgrat orientierte Acylkettenhälfte wirkt, während Hopanoide auch einen ordnenden Effekt auf das Acylkettenende haben. Im Falle von DAMPC scheinen die ungleichen Mechanismen eine quantitativ gleiche Kondensation zu bewirken.

Das Verhalten von THBH/HGL unterhalb des Phasenübergangs von DPPC und DiMPC ist in der Tendenz mit dieser Interpretation konsistent. Verglichen mit Cholesterin bewirkt THBH nicht nur eine Konformationsänderung in DPPC, sondern auch noch vergrößernd auf die Acylkettenquerschnitte. Die Vergrößerung der Lipidquerschnitte durch HGL ist in der Größenordnung, daß sich die Moleküle additiv anordnen. Beide Befunde sprechen für eine verschlechterte Interaktion, möglicherweise wieder im Bereich der ersten 10 C-Atome der Acylketten, aber auch für eine noch weiter gestörte Ordnung durch die zusätzliche Fettsäure von HGL, vermutlich hauptsächlich im Bereich der Acylkettenenden. Analog verhalten sich DiMPC-Mischungen der flüssig-kondensierten Phase, die eine grundsätzlich gleiche Interpretation nahelegen. Der bei 4°C bereits teilweise in kondensiertem Zustand befindliche Film von DAMPC sollte also in seinen expandierten Teilen von Cholesterin / THBH / HGL gleich kondensiert werden, in seinen flüssig-kondensierten Bereichen aber die unterschiedliche Wirkung der Triterpenoide widerspiegeln. Die tatsächlich gefundene abnehmende Kondensation von Cholesterin über THBH zu HGL ist damit konsistent.

Die wesentlichen Befunde, daß a) Cholesterin besser kondensiert als die untersuchten Hopanoide und b) daß die Kondensation von Lipiden mit geraden zu verzweigten Acylketten mit Hopanoiden wächst, konnte schon in natürlichen Membranen bewiesen werden (KANNENBERG, 1979).

Das Verhalten von DCDPC ist von den bisher geschilderten Molekülinteraktionen verschieden. Bei 40°C ist die kondensierende Wirkung von THBH etwa doppelt so hoch wie die von HGL und nicht wie in den restlichen PCs gleich. Die Kondensation durch Cholesterin ist noch einmal um den Faktor 2 größer als die von THBH. Das Mischverhalten von DCDPC bei 4°C entspricht dem von DPPC und DIHPC in etwa; allerdings ist die Flächenreduzierung durch Cholesterin stärker und die von THBH schwächer als die in diesen beiden Lipiden. HGL verhält sich nicht neutral, sondern wirkt stark flächenvergrößernd.

Das Verständnis für dieses Verhalten ist vor dem noch geringen Datenmaterial weitgehend spekulativ. Ein einfaches flüssig-expandiertes Molekül im Meßbereich anzunehmen, scheint wegen der kondensierten Isotherme bei 1°C und der unterschiedlichen Wirkung von THBH und HGL - in allen anderen PCs wirkten die Hopanoide auf der Acylkettenbasis gleich - wenig wahrscheinlich. Eine der wesentlichen Konsequenzen aus der schon angesprochenen umgekehrten Orientierung von Sterolen und Hopanoiden ist, daß Cholesterin mit einem beweglich bleibenden Isooctanarm in die Membranmitte reicht (STOFFEL et al., 1974; JAIN, 1975), während THBH und HGL mit ihren voluminösen Ringgerüsten den Acylkettenenden benachbart sind Die geringe Kondensation von THBH gegen Cholesterin und ihre noch stärkere Reduzierung durch das in der Membranmitte aufgetriebene HGL legt den Schluß nahe, daß auch in DCDPC die Kondensation stark vom Acylkettenende des Lipids mitbestimmt wird. Eine Erklärung des Verhaltens könnte in einer schon für den reinen Lipidfilm angesprochenen erhöhten Ordnung zum Acylkettenende hin liegen, die in Lipiden mit geraden Ketten zur Membranmitte hin stark abnimmt (SEELIG, SEELIG, 1974). Danach sollte der bei 4°C kondensierte und geordnete Zustand infolge von Van-der-Waals-Interaktion und/oder kinetischer Hemmung durch die voluminöseren Cyclohexanringe nicht kooperativ seine Ordnung verlieren, sondern eher einer temperaturabhängigen Auflockerung unterliegen. Konsequenzen eines solchen Modells wären ein höherer Ordnungsgrad, aber auch eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine vergleichsweise geringe Fluidität bzw. hohe Viskosität

der Membran. Letztere Konsequenz konnte bereits durch BLM-Messungen an DCDPC bewiesen werden (BENZ et al., 1983). Die starken Kondensationen von Cholesterin in DCDPC sind in diesem Modell durch die Wirkung von Cholesterin auf die ersten 10 C-Atome der Acylkette und durch den geschmeidigen Seitenarm, der sich dem Ordnungszustand anpaßt, zu erklären. Das starre THBH, aber vor allem das am hydrophoben Molekülende aufgetriebene HGL interagieren schlechter bzw. ist im Falle von HGL bei 4°C inkompetent kondensierend oder neutral in die Ordnung einzugreifen und expandiert.
Wenn die Vorstellung der erhöhten Ordnung am hydrophoben Ende von DCDPC zutrifft, sollte die Acylkettenlänge eine wichtige Rolle spielen. Nicht auszuschließen ist, daß die physiologischen Kettenlängen von $C_{17:0}$ und $C_{19:0}$ wesentlich besser mit den Hopanoiden zusammenpassen als das hier untersuchte $C_{18:0}$ ω-cyc-PC. Auffällig ist immerhin am Kalottenmodell, daß die beiden Seiten des Hopanoidgerüstes nicht äquivalent sind. Auf einer Seite stören Methylgruppen den D und E Ring nicht, während auf der anderen Seite der A und B Ring ideal planar ist. Betrachtet man das Molekühl von der Seite, werden zwei Taschen sichtbar, einmal in der oberen Hälfte des Ringgerüstet, im anderen Fall in der unteren Hälfte. Eine Konstellation, die durchaus Passung für große Kohlenwasserstoffringe sein könnte.

Ein nach wie vor diskutiertes Problem ist die molekulare Packung von Sterolen mit Lipiden (ENGELMANN, ROTHMANN, 1972; MARTIN, YEAGLE, 1978; CORNELL et al., 1979; CADENHEAD et al. 1976; GERSHFELD, TAJIMA,1977; LUNDBERG, 1982; MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979; ALBRECHT et al., 1981; CADENHEAD, MÜLLER-LANDAU, 1979; DEMEL, DE KRUYFF, 1976). Die mit Cholesterin gefundenen maximalen Kondensationen zwischen 30 und 50 mol% Cholesterin stimmen gut mit den für verschiedene Lipide diskutierten Verhältnissen überein. Höhere Konzentrationen haben wegen zunehmender Cholesterin/Cholesterin-Wechselwirkungen oder gar Cholesterin-Entmischungen keinen Einfluß mehr (ALBRECHT et al., 1981; MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD, 1979). Die hohen Kondensationen haben in erster Linie ihre Ursache in der guten hydrophoben Wechselwirkung zwischen Cholesterin und Lipidacylketten (DEMEL, DE KRUYFF, 1976). Für niedrige Konzentrationen unter 10 mol% Sterol gehen MÜLLER-LANDAU, CADENHEAD (1979) von einer Lage Lipidmoleküle aus, die direkt von Cholesterin kondensiert wird, während die Restlipidphase durch Fernwirkungen ebenfalls bereits von Cholesterin beeinflußt

wird. Auf der Basis der 10 mol% Werte erreichen Hopanoide durchaus vergleichbare Kondensationen wie Cholesterin. Legt man den Einfluß auf den Phasenübergang von DPPC und DIHPC zugrunde, wirken sie mindestens so gut wie Cholesterin, wenn nicht sogar stärker. Die größten Kondensationen treten dann etwa bei 20 mol% Hopanoid auf (Ausnahme DAHPC), sind aber wesentlich schwächer als von Cholesterin. Nach diesem Modell von MÖLLER-LANDAU, CADENHEAD (1979) kondensieren aufgrund der Fernwirkung Hopanoide wie Cholesterin und erst die durch spezifische hydrophobe Wechselwirkungen bedingten maximalen Kondensationen sind durch sterische Hinderungen schlechter. Warum höhere Konzentrationen als 20 mol% keinen weiteren Effekt zeigen, ist noch unklar. Interessanterweise ist es die Sättigungskonzentration, bei der, nach dem MÖLLER-LANDAU-CADENHEAD-Modell, alle Acylketten in direkter Nachbarschaft zu Hopanoid gedacht werden können. Höhere Konzentrationen könnten Phasentrennung verursachen, etwa infolge von begrenzter Löslichkeit (ALBRECHT et al., 1981; DEMEL et al., 1972a), oder ein homogenes Zweikomponentensystem, das sich nicht direkter packen läßt, bewirken.

Aus der großen Zahl von Arbeiten über die Cholesterin/Lipid-Wechselwirkung kommen DEMEL, DE KRUYFF (1976) zu dem Schluß, daß das zur Kondensation notwendige molekulare Inventar die 3 β-Hydroxylgruppe, die planare Ringstruktur und die Seitenkette sind. Der Befund, daß Epicholesterin (3 α-OH) nur eine geringe Kondensation bewirkt, hat zu einer großen Zahl von Untersuchungen geführt, die eine direkte Wasserstoffbrückenbildung zwischen einer der Membrankomponenten als Ursache zu beweisen suchten (HUANG, 1977; LANCEE-HERMKENS, DE KRUYFF, 1977; VANDENHEUVEL, 1965; BROCKERHOFF, 1974; LONG et al., 1970; DARKE et al., 1972; GODICI, LANDSBERGER, 1975; CHATTERJIE, BROCKERHOFF, 1978). Obwohl eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Cholesterin und Phospholipid nicht nachgewiesen ist (DE KRUYFF et al., 1973b) beweist doch die Sensibilität der Kondensation gegen Epicholesterin, aber auch die kondensierende Wirkung von Hydroxylgruppen in Modell-Lipiden (BROWNING, 1981) den prinzipiellen Einfluß auf die kondensierende Potenz. Als hydrophile Entsprechung tragen THBH und HGL vier OH-Gruppen bzw. drei OH-Gruppen und das hydrophile Glucosamin. Die doch wesentlich erhöhte Zahl der denkbaren OH-Interaktionen sollte den Einfluß des hydrophilen Kopfes erhöhen. Dies scheint in den untersuchten PC-Systemen nicht der Fall. Einmal spricht die schwächere Kondensation verglichen mit Cholesterin dagegen, aber

vor allem ist die weitgehend gleiche Kondensation von THBH und HGL bei völlig verschiedenen hydrophilen Köpfen ein Gegenbeweis; trotzdem könnte erleichterte Wasserstoffbrückenbindung mit anderen Lipidkopfgruppen einer der wesentlichen Vorzüge von Hopanoiden sein. Die anderen beiden Strukturnotwendigkeiten betreffen das Ringgerüst und den Seitenarm, mithin die hydrophobe Interaktion. Arbeiten zu diesem Problem stellen einen weiteren Komplex der Cholesterin-Literatur dar (ENGELMANN, ROTHMANN, 1972; KROON et al., 1975; OPELLA et al., 1976; HUANG, 1977). Wesentlich scheint neben den stabilisierenden Eigenschaften eines Ringgerüstes die Länge des hydrophoben Bereiches. Optimale Kondensationen zeigen Cholesterin, mit einem 19,1 Å langen hydrophoben Bereich (ROHMER et al., 1979), und Lipide mit einer Reihe von Acylketten um dei 20 Å (Tab. 1). Sukzessive abnehmende Kondensationen können durch Verkürzung der Lipidkettenlänge oder durch Degradierung des Cholesterin-Seitenarmes erreicht werden. Die minimale Länge für zur Kondensation genügend starker hydrophober Wechselwirkungen liegt bei 10 Å; dies entspricht einer völligen Degradierung des Cholesterin-Seitenarmes oder einer Verkürzung der Acylkette auf 10 C-Atome (PETHICA, 1955; JOOS, DEMEL, 1969; SUCKLING, BOYD, 1976; CRAIG et al., 1978; NAKAMURA et al., 1980; SUCKLING et al., 1979).

Nach dieser differenzierten Betrachtung wird klar, daß alle untersuchten Hopanoide das gesuchte strukturelle Inventar auch im hydrophoben Bereich besitzen. THBH und HGL haben einen 18,4 Å langen hydrophoben Bereich, der im Falle von Diplopterol noch 14,2 Å beträgt (ROHMER et al., 1979; OURISSON, ROHMER, 1982).

Zusammenfassend läßt sich zur Interaktion von PC mit THBH und HGL sagen, daß sie, wie von ROHMER et al. (1979) postuliert, cholsterinanalog wirken. Die intermolekularen Wechselwirkungen scheinen allerdings von Cholesterin und Hopanoiden sehr verschieden.

3.4. Permeabilitätsversuche

Die an Liposomen gemessenen relativen Permeabilitäten erlauben die Beurteilung der physiologisch wichtigen Barriereeigenschaften einer Lipiddoppelschicht.
Untersucht wurden die Barriereeigenschaften von DCDPC und die permeabilitätssenkende Wirkung von Hopanoiden in Ei-PC und DCDPC.

3.4.1. Ei- PC/Triterpenoid-Permeabilitäten

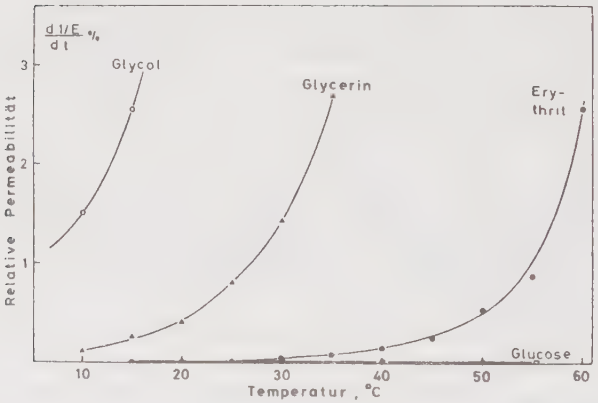


Abb. 38: Schwellrate von Liposomen aus Ei-PC in isotonischen Lösungen aus Glycerol, Glycerin, Erythrit und Glucose

Für Ei-PC wurde von BLUME (1976) ein Phasenübergang von 19,0 °C bestimmt. Das Lipidgemisch befindet sich also im Meßbereich oberhalb seines Phasenübergangs. Die Kurven zeigen, daß die Permeabilitäten von der Größe der permeierenden Moleküle abhängig sind.

Die gefundenen relativen Permeabilitäten für dieses Ei-PC lagen etwas niedriger als die von DE GIER et al. (1968, 1971) publizierten Werte.

Die Permeabilitäten zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit, die nach der Arrhenius-Gleichung folgenden quantitativen Zusammenhang mit der Permeabilität hat:

$$P = P_o \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Dabei ist P die Permeabilität, R die Gaskonstante, T die Temperatur in ^oK und E_a die Aktivierungsenergie. Es ergibt sich aus diesem Zusammenhang, daß der natürliche Logarithmus der Permeabilität oder hier der Schwellraten gegen $\frac{1}{T}$ aufgetragen eine Steigung hat, die $-\frac{E}{R}$ gleich ist.

Die auf diese Art ermittelten Aktivierungsenergien für die verschiedenen Moleküle waren $E_a^{Gloycol}$ = 16,1 kcal/mol, $E_a^{Glycerin}$ = 21,7 kcal/mol und $E_a^{Erythrit}$ = 26 kcal/mol.

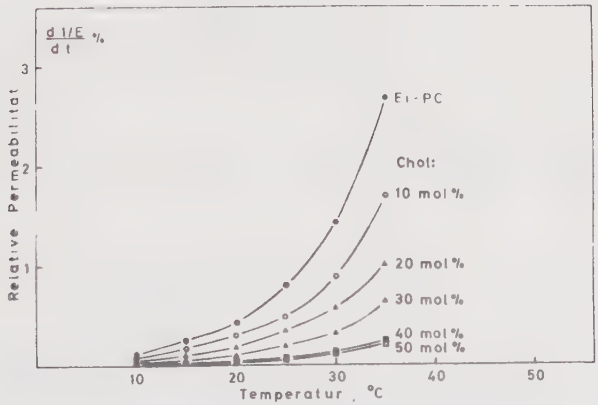


Abb. 39: Schwellrate für Ei-PC-Liposomen mit wechselnden Anteilen an Cholesterin in isotonischer Lösung

Abb. 39 zeigt die ebenfalls schon von DE GIER et al. (1968) beschriebene reduzierte Permeabilität von Ei-PC durch Cholesterin. Auffallend ist die angenähert lineare Abhängigkeit von der Konzentration an Cholesterin. Der Zusammenhang wird nur bei 50 mol% Cholesterin durchbrochen; für diese Konzentration wurde aber eine leichte Kristallbildung im Präparat beobachtet, offenbar aus reinem Cholesterin. Die Aktivierungsenergien der Glycerinpermeabilität sind unabhängig von der Cholesterin-Konzentration (Tab. 11).

Mit zunehmender Diplopterol-Konzentration zeigt die Permeabilität ebenfalls einen annähernd linearen Abfall.

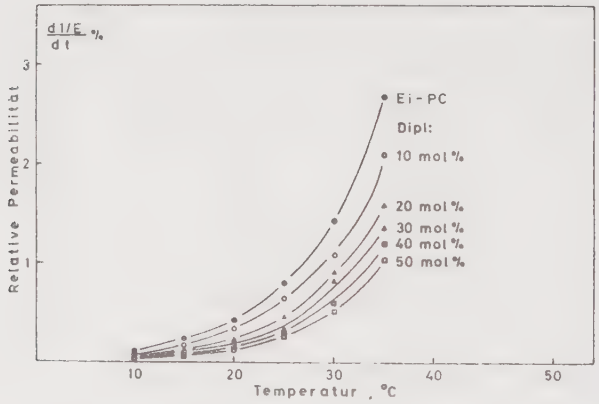


Abb. 40: Schwellrate von Ei-PC-Liposomen mit wachsenden Anteilen an Diplopterol in isotonischer Glycerinlösung

Für höhere Diploterol-Konzentrationen wurde ebenfalls eine Kristallbildung im Präparat beobachtet, die stärker als die von Cholesterin war. Die Aktivierungsenergien sind Diplopterol-unabhängig (Tabl 11)

Die in Gegenwart von HGL gemessenen Permeabilitäten sanken nur bis zu einer Konzentration von 20 mol% und nahmen mit höheren Konzentrationen wieder zu. Für höhere Konzentrationen bildete sich noch ein wesentlich stärkerer Kristallkörper im Präparat aus, als er schon für Diplopterol beobachtet wurde. Offenbar aus diesem Grund streuen die 50 mol%-Werte so stark, daß sie nicht verwendet werden konnten und die Werte bei 30 und 40 mol% sind mit Skepsis zu betrachten. Die Aktivierungsenergien für diesen Prozeß sind auch von HGL unabhängig (Tab. 11)

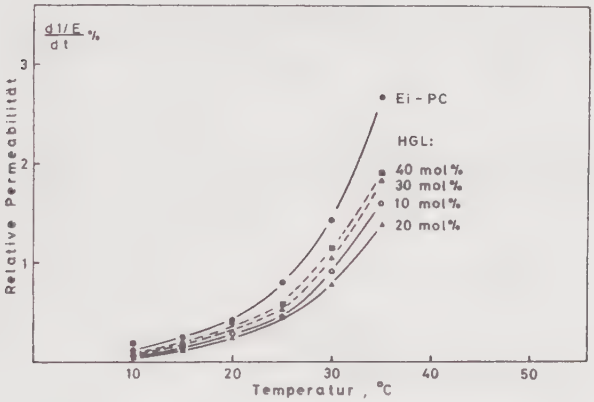


Abb. 41: Schwellrate von Ei-PC-Liposomen mit steigenden Konzentrationen an Hopanglycolipid in isotonischer Glycerinlösung

Bei der vergleichenden Darstellung in Abb. 42 wird sichtbar, daß für 10 mol% die Permeabilitätsreduzierung durch HGL etwa gleich der von Cholesterin ist. Erst bei 20 mol% zeigt Cholesterin wesentlich geringere Permeabilitätsraten. Die Wirkung von Diplopterol ist in beiden Konzentrationen schwächer als die von HGL und Cholesterin. Wegen des erwähnten Auskristallisierens von HGL war der Vergleich von höheren Konzentrationen nicht möglich.

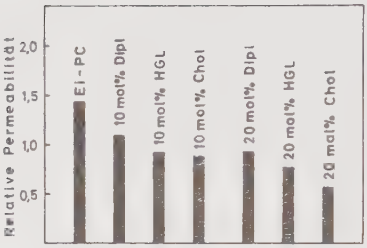


Abb. 42: Schwellrate von Ei-PC bei 30°C in isotonischer Glycerinlösung mit 10 und 20 mol% der untersuchten Triterpenoide

3.4.2. DCDPC/Triterponoid

Abb.43a zeigt, daß auch die Permeabilitätsraten von DCDPC von der Größe des permeierenden Moleküls abhängt.

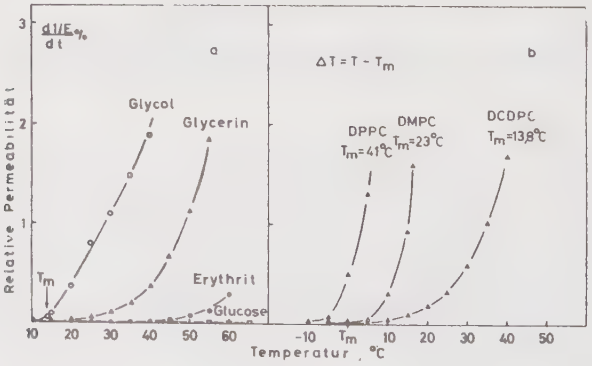


Abb. 43: Schwellrate von DCDPC-Liposomen in isotonischen Lösungen von Glycol, Glycerin, Erythrit und Glucose: a) relative Permeabilitäten in den verschiedenen isotonischen Lösungen, b) Schwellrate in Glycerin aufgetragen gegen die Temperaturdifferenz zum Phasenubergang: DPPC und DMPC wurden DE GIER et al. (1968) entnommen.

Triterpenoid	Aktivierungsenergie E_a von Ei-PC/Tripernoid-Liposomen			Aktivierungsenergie E_a von DCDPC/Triterpenoid Liposomen		
	Cholesterin	Diplopterol	HGL	Cholesterin	Diplopterol	HGL
mol%	kcal/mol			kcal/mol		
0	21,7	21,7	21,7	22,3	22,3	22,3
10	21,2	22,7	22,6	24,1	22,8	22,3
20	20,4	22,9	22,3	22,4	23,6	22,8
30	22,9	23,4	21,1	-	23,6	22,8
40	21,7	23,5	20,9	25,5	-	-
50	23,6	25	-	28,7	-	-

Tab. 11: Aktivierungsenergien E_a für die Permeabilität von Glycerin in Ei-PC (DCDPC)/ Triterpenoid-Liposomen

Für reine Lipide ist in der Literatur im Bereich des Phasenübergangs eine dramatische Erhöhung der Permeabilität beschrieben (DE GIER et al., 1968, SESSA, WEISSMANN, 1968; MARSH et al., 1976). Abb. 43 zeigt die relativen Permeabilitäten von DCDPC, DPPC und DMPC aufgetragen gegen die Temperaturdifferenz zu ihrem jeweiligen Phasenübergang. Während DPPC in seiner Acylkettenlänge in etwa DCDPC entspricht, liegen die Phasenübergänge von DMPC und DCDPC nur 10^{o}C auseinander und zeigen daher von der energetischen Seite sehr viel mehr Verwandtschaft als DPPC mit DCDPC.

Verglichen mit beiden Systemen wird aber deutlich, daß DCDPC ein sehr ungewöhnliches Permeabilitätsverhalten zeigt. Erst 20 bis 30^{o}C oberhalb des Phasenüberganges erhöht es schwach die Permeabilitäten, ohne Unstetigkeiten im Phasenübergangsbereich. Die Temperaturabhängigkeit der Glycerinpermeabilität ist im Vergleich zu DPPC als auch zu DMPC drastisch reduziert.

Aus dem "Arrhenius-Plot" wurden folgende Aktivierungsenergien errechnet: E_a^{Glycol} = 14,3 kcal/mol, $E_a^{Glycerin}$ = 20,9 kcal/mol, $E_a^{Erythrit}$ = 27,4 kcal/mol. Die Aktivierungsenergien sind demnach gleich denen von Ei-PC. Die Abweichungen gegen diese Werte liegen im Rahmen der Meßgenauigkeit dieser Methode.

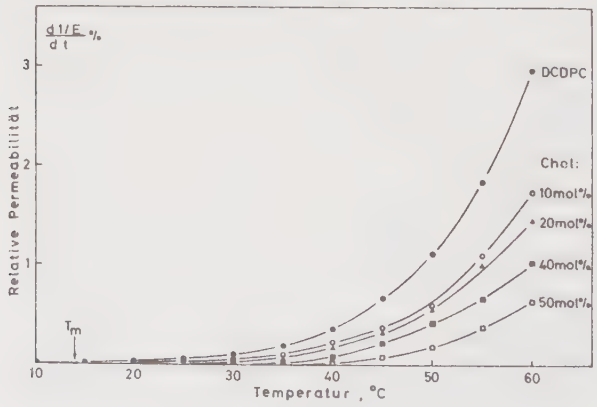


Abb. 44: Schwellrate von DCDPC in isotonischer Lösung von Glycerin in Abhängigkeit von zugesetztem Cholesterin

Cholesterin verursacht reduzierte Permeabilitäten, die in etwa linear mit der zugesetzten Konzentration an Cholesterin abnehmen. Die Wirkung gleicht angenähert der von Cholesterin in Ei-PC, nur ist sie zu höheren Temperaturen hin verschoben. Für hohe Konzentrationen von Cholesterin wurden auch in diesem System Kristallkörper - wahrscheinlich aus reinem Cholesterin - gefunden. Die Aktivierungsenergien hängen nicht von der Konzentration an zugesetztem Cholesterin ab (Tab. 11). Der 50 mol%-Wert könnte ein Meßfehler sein, aber auch mit dem schon erwähnten Auskristallisieren von Cholesterin zusammenhängen.

Von Diplopterol wird die Permeabilität von DCDPC bis zu einer Konzentration von 20 mol% stark verringert. 30 mol% Diplopterol zeigt nur noch eine schwache Reduzierung der Permeabilität gegen den 20 mol% Wert, und höhere Diplopterolanteile erhöhten die Permeabilität dramatisch und unregelmäßig. Schon bei 20 mol% konnte eine schwache Kristallbildung beobachtet werden, die mit steigenden Konzentrationen stark zunahm. Die Aktivierungsenergien sind ebenfalls Diplopterol-unabhängig (Tab. 11).

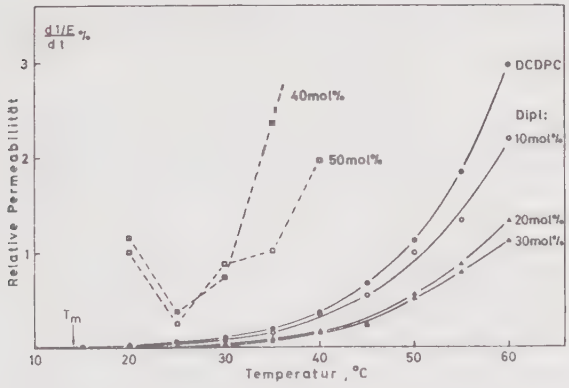


Abb. 45: Schwellrate von DCDPC-Liposomen in isotonischer Glycerinlösung mit steigenden Konzentrationen an Diplopterol

Wie in Abb. 46 ersichtlich, zeigen 10 mol% HGL nur eine äußerst geringe Veränderung der Permeabilität von DCDPC. Für 20 und 30 mol% HGL wurde eine geringe und ungefähr gleiche Reduzierung gefunden, höhere HGL-Konzentrationen waren nicht auswertbar. Alle mikroskopisch untersuchten

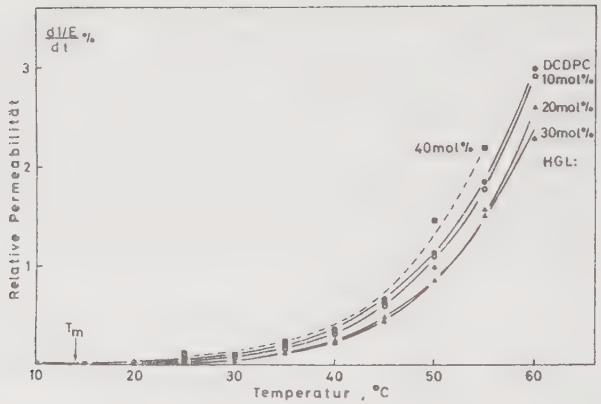


Abb. 46: Anfängliche Schwellrate von DCDPC-Liposomen in isotonischer Glycerinlösung in Abhängigkeit von zunehmender HGL-Konzentration

Lipidpräparate enthielten HGL-Kristalle. Präparate mit höheren Konzentrationen an HGL schienen zu einem erheblichen Teil nur noch aus diesen Kristallen zu bestehen. Aus den Aktivierungsenergien in Tab. 11 wird ersichtlich, daß sie nicht von HGL abhängen.

In Abb. 47 ist im Vergleich die Permeabilitätsreduzierung durch 10 und 20 mol% Triterpenoid dargestellt. Auffallend ist der schwache Effekt von

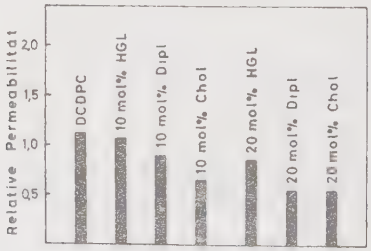


Abb. 47: Schwellraten von DCDPC-Liposomen bei 50°C in isotonischer Glycerinlösung und 10 bzw. 20 mol% Triterpenoid

HGL und die doch ziemlich starke Verringerung der Schwellrate durch Diplopterol; bei 20 mol% scheint die Wirkung gleich der von Cholesterin.

3.4.3. Diskussion der Permeabilitätsergebnisse

Für Sterole wurde nachgewiesen, daß ihre Fähigkeit, im Monolayer kondensierend zu wirken, parallel läuft mit der Fähigkeit, die Permeabilität zu reduzieren. Eine Ausnahme bilden Ketosteroide, die trotz Monolayerkondensation keine Effekte auf die Permeabilität zumindest kleiner organischer Moleküle zeigen (DEMEL et al., 1972a,b,c). Dieses nicht einheitliche Verhalten zwingt dazu, das physiologisch bedeutsame Barriereverhalten von Membranen direkt zu untersuchen und erlaubt nicht, aus den Molekülinteraktionen unmittelbar Rückschlüsse zu ziehen.

Die Permeabilität von nichtelektrolytischen Substanzen hängt von der Molekülgröße,ihrer Form, der Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen,und von deren Anzahl ab(STEIN, 1967; DIAMOND, KATZ, 1974; COHEN, 1975). Entsprechend diffundiert Glycol sehr viel schneller als Glycerin durch eine Lipidmembran und dieses schneller als Erythrit (DE GIER et al., 1971).
Auf der Membranseite wird die Permeabilität von der Lipidpackung, der Beweglichkeit der Acylketten und der Ladung des Lipidkopfes beeinflußt (zusammenfassend: JAIN, 1980; BITTMANN, BLAU, 1972). Eine große Zahl experimenteller Befunde über die Permeabilität von Nichtelektrolyten zeigte, daß sie entscheidend von der Fluidität und der Membranordnung abhängt (VAN DEENEN, 1971; DEMEL, DE KRUYFF, 1976; JAIN, 1980). Folgerichtig wirken Faktoren, die die Acylkettenordnung und die zwischenmolekularen Wechselwirkungen stören, permeabilitätserhöhend. Dazu zählen Temperatur, ungesättigte und verzweigte Fettsäuren, Acylkettenverkürzung und abnehmende Konzentrationen an Cholesterin (DE GIER et al. 1968 und 1969; DEMEL et al., 1972b; INOUE, 1974; MCELHANEY et al. 1970; MCELHANEY et al. 1973; GALLUCI et al. 1975; CLEJAN et al. 1979; DEMEL, DE KRUYFF, 1976).

3.4.3.1. Ei-PC und DCDPC Permeabilitäten

Das verwendete Ei-PC setzte sich aus 41,8% gesättigten und 56,9% ein- bis mehrfach ungesättigten Fettsäuren zusammen. Der Phasenübergang von Ei-PC wurde z.B. von BLUME (1976) mit -19°C bestimmt. Die dargestellte Meßreihe gibt demnach die Barrierefunktion der flüssig-kristallinen Phase dieses Lipidgemischs wieder. Die gefundenen Permeabilitätsraten für Glycol, Glycerin, Erythrit und Glucose reflektieren ihre Abhängigkeit von den Molekülparametern (JAIN, 1980). Alle gefundenen Permeabilitätsraten und Abhängigkeiten von molekularen und physikalischen Parametern sind in der Literatur gut dokumentiert (DE GIER et al., 1968; De GIER et al., 1971; DE GIER et al., 1969).
Die von mir gefundenen Aktivierungsenergien für den Permeabilitätsprozeß liegen leicht über den Literaturwerten (DE GIER et al., 1971; MCELHANEY et al., 1973; COHEN , 1975; TIRRI et al., 1977).
Eine Erklärung für die regelmäßigen Abweichungen zu höheren Werten fällt nach dem bisherigen Ergebnismaterial noch schwer. Den Werten fehlt noch eine breitere statistische Basis, so daß der Fehler im Bereich von ± 2 bis 3 kcal/mol liegen dürfte. Die gleichmäßige Verschiebung zu höheren Werten deutet allerdings einen systematischen Einfluß an, den erst kommende Untersuchungen an bekannten Systemen eruieren können.

Alle im Ergebnisteil aufgelisteten Aktivierungsenergien für Ei-PC, DCDPC und die diversen Gemische mit Triterpenoiden sind aber insoweit mit der Literatur konsistent, indem sie die Unabhängigkeit der Aktivierungsenergien von der Membranzusammensetzung zeigen. So liegen die Aktivierungsenergien in allen von mir gemessenen Lipidsystemen für Glycol bei 16 kcal/mol, die von Glycerin bei 22 kcal/mol und die von Erythrit bei 26 - 27 kcal/mol.
Aus diesem Befund schlossen eine Reihe von Autoren, daß diese kleinen polaren Moleküle einzeln und völlig wasserfrei die Membran passieren (STEIN, 1967; DE GIER et al., 1971; MCELHANEY et al., 1973). Danach wäre der limitierende Schritt der Permeationsrate die Dehydratisierung der polaren Moleküle in der Interphase; möglicherweise spielt die Translokation der Moleküle von der Interphase in den hydrophoben Bereich und die anschließend ausgelöste Konformationsisomerisierung beim Durchtritt ebenfalls eine Rolle (BLOK et al., 1977; CLEJAN et al., 1979). Gestützt wird diese Hypothese neben den experimentellen Befunden auch durch die

theoretische Überlegung, daß die Dehydratisierung mit Wasserstoffbrückenbindungsbruch verbunden sein muß. Jede Hydroxylgruppe kann als Donor und Akzeptor einer H-Brücke operieren, woraus sich die maximalen H-Bindungen für Glycol mit 4, für Glycerin mit 6 und für Erythrit mit 8 errechnen. Da die drei Moleküle 1,2 bzw. 3 intramolekulare Wasserstoffbrücken erwarten lassen, wäre die Zahl der zu brechenden Wasserstoffbrücken zu Wasser für Glycol 3, für Glycerin 4 und für Erythrit 5 oder weniger. Aus den mit 5 kcal/mol (DE GIER et al., 1971) veranschlagten Wasserstoffbrückenbindungsbruch errechnen sich die theoretischen Aktivierungsenergien mit E_a^{Glycol}: 15 kcal/mol, $E_a^{Glycerin}$: 20 kcal/mol und $E_a^{Erythrit}$: 25 kcal/mol. Die von mir ermittelten Aktivierungsenergien korrelieren gut mit den aus der Hypothese deduzierten Werten, so daß diese ihrerseits von den vorliegenden Ergebnissen verifiziert wird.

Wie man es für die verschieden geordneten Menbranzustände reiner Lipide erwartet, ist die Permeabilität in der kristallinen Phase in der Regel niedriger als in der flüssig-kristallinen Phase (VAN ZOELEN et al.,1975).Im Bereich des Phasenübergangs ist die Permeabilität größer als in jedem der beiden Zustände infolge von Störstellen der Membran an den Schollenrändern der verschiedenen Zustandsbereiche (DE GIER et al., 1968; SESSA, WEISSMANN,1968; MARSH et al., 1976; JAIN, 1980).
DCDPC ist ein PC mit einem kalorimetrisch gemessenen Phasenübergang bei 13,8°C. Überraschenderweise zeigen die Permeabilitäten von DCDPC im Bereich des Phasenübergangs keinerlei Diskontinuitäten (Abb. 43) und verhalten sich eher wie Lipide in einer einheitlich flüssig-kristallinen Phase. Da die Permeabilitätsraten selbst bis zu 20 bis 30°C oberhalb und unterhalb des Phasenübergangs keine Unregelmäßigkeiten aufweisen, in einem Bereich, den DE GIER et al. (1971) an Lipiden mit geraden Acylketten am stärksten beeinflußt fanden, zeigt DCDPC eine erhebliche Anomalie gegenüber diesen Lipidsystemen.
In eine ähnliche Richtung weisen Versuche von ENDO et al. (1982), die an den zu DCDPC homologen DCUPC und DCTPC Glucosepermeabilitäten gemessen haben. Sie fanden keinerlei Permeabilität oberhalb der kalorimetrisch bestimmten Phasenübergänge, während geradkettige Kontrollsysteme permeabel waren. Andererseits fanden sie, daß DCUPC (DCTPC)-Liposomen im Phasenübergang vollkommen durchlässig sind und erst 10°C über dem Phasenübergang glucosedicht werden. Allerdings scheinen die Erebnisse dieser Arbeitsgruppe in sich nicht vollkommen konsistent, da von ihnen publizierte

Fluoreszenzdepolarisationen mit DPH an den gleichen Lipiden nicht die zu erwartende drastische Abnahme im Ordnungsgrad im Bereich des Phasenübergangs zeigen, sondern einen linearen Zusammenhang mit der Temperatur (SUNAMOTO et al., 1982). Dieses Verhalten erklärt zumindest nicht den starken Effekt des Phasenübergangs auf die Glucosepermeabilität.

Von dem noch strittigen Problem der Permeabilität im Phasenübergangsbereich abgesehen, sind jedoch beide Studien soweit konsistent, daß sie eine drastisch verringerte Permeabilität gegen Vergleichssysteme für kleine nichtelektrolytische Moleküle in PC-Liposomen mit endständigen Cyclohexanringen an den Acylketten oberhalb des Phasenübergangs finden. Nach dem eingangs schon erwähnten Zusammenhang zwischen Permeabilität und der Membranfluidität und -ordnung (STEIN, 1967; DE GIER et al., 1971; MCELHANEY et al., 1973; DEMEL, DE KRUYFF, 1976; LALA et al., 1978) deutet dieses Permeabilitätsverhalten auf eine verringerte Fluidität und einen erhöhten Ordnungsgrad in diesen Lipiden hin. Gestützt wird diese Interpretation durch Befunde von BENZ et al. (1983) an 'black lipid membranes' (BLM), bei denen die Autoren aus einer reduzierten Translokationsrate eines Kationkomplexes auf eine relativ hohe Mikroviskosität der Membran oberhalb des Phasenübergangs geschlossen haben.

Die Betrachtung der Aktivierungsenergien führt zu ähnlichen Schlüssen. Nach DE GIER et al. (1971) wird der Zusammenhang zwischen der Permeabilität und der molaren Entropie und Enthalpie der Aktivierung beschrieben zu:

$$P = \frac{\lambda}{2} \frac{kT}{n} e^{\frac{\Delta S^*}{R}} \cdot e^{-\frac{\Delta H^*}{RT}}$$

Dabei ist λ ein Membranparameter und gibt die Distanz zweier aufeinanderfolgender Energieminima in der Membran an, k ist die Boltzmann-Konstante, h die Planck'sche Konstante und ΔS^* und ΔH^* die molare Entropie und Enthalpie der Aktivierung. Nach GLASSTONE et al. (1941) ist die Aktivierungsenergie E_a aus dem 'Arrhenius-Plot' eng mit der molaren Aktivierungsenthalpie verwandt ($\Delta H = E_a - RT$) und differiert lediglich um etwa 0,6 kcal. Aus den gleichen Aktivierungsenergien E_a für eine Vielzahl von Lipidsystemen - im gleichen isotonischen Ansatz und im angenähert gleichen physikalischen Zustand - kommen DE GIER et al. (1971) nach der Obigen Gleichung zu dem Schluß, daß die Aktivierungsenergien nicht die

Unterschiede in den Permeabilitätsraten bedingen können. Sie gehen von Unterschieden in der Aktivierungsentropie aus, die mit unterschiedlichen Packungsdichten und Beweglichkeiten der Acylketten korreliert werden. Die Vergleichbarkeit der von mir gefundenen Aktivierungsenergien für DCDPC mit denen von DE GIER et al. (1971) für Lipide mit der gleichen Kopfgruppe (Phosphatidylcholin) sollte den Schluß erlauben, daß die verringerten Permeabilitäten von DCDPC auf eine erniedrigte molare Aktivierungsentropie zurückgeht, die bei den gleichen Lipidköpfen in erster Linie von der Acylkettenpackung und -mobilität abhängen sollte.

Aus dem Studium von Nichtelektrolytpermeationen in Membranen aus roten Blutkörperchen kommen GALEY et al. (1973) zu dem Schluß, daß sowohl die Phasengrenze als auch das Innere der Bilayermembran als Diffusionsbarriere wirken. JAIN (1980) beschreibt den allgemeinen Prozeß des Permeierens in folgenden Schritten:

1) Transfer über die Phasengrenze
2) Dehydratisierung des permeierenden Moleküls
3) Diffusion durch den hydrophoben Bereich.

Da keinerlei Information über die Kopfgruppenkonformation von DCDPC vorliegt, sei die plausibel wirkende Annahme erlaubt, daß sie nicht wesentlich von anderen PCs abweicht. Unter dieser Annahme sollten Schritt 1 und 2 der Diffusion nicht wesentlich gegen andere PCs verändert sein. Diese Betrachtung der Permeabilität als Diffusionsprozeß legt also nahe, daß die geringe Permeabilität von DCDPC mit einem hohen Diffusionswiderstand im hydrophoben Bereich der Membran korreliert. TRÄUBLE (1971) und andere Autoren (LIEB, STEIN, 1969; HANAI, HAYDEN, 1966; PRICE,THOMPSON, 1969; FINKELSTEIN, CASS, 1968; REEVES, DOWBEN, 1970) schlugen vor, daß der Transport von Wasser und kleinen Molekülen in mobilen Aussparungen der Acylketten stattfindet, die temperaturabhängig als gtg-Kinken von der Acylkette gebildet werden. Validität bekommt dieser Ansatz durch den Diffusionskoeffizienten von Wasser, der recht gut mit dem aus der Hypothese abgeleiteten Diffusionskoeffizienten übereinstimmt (JAIN, 1980, SACKMANN, 1982). Es ist ein verlockender Gedanke, anhand des geschilderten Permeationsverhaltens von DCDPC die Kinkenhypothese weiter zu bestätigen. Nach ihr muß man für das geschilderte Permeationsverhalten eine ver-

minderte Kinkenzahl pro Acylkette annehmen, deren Bestimmung über die Ramanspektroskopie zugänglich sein sollte.
Wenn von der Richtigkeit des Kinkenmodells ausgegangen wird, wird aber die neue Frage aufgeworfen, wie die verringerte Zahl an Kinken zustande kommt. Es muß angenommen werden, daß die trans-gauche Isomerisierung energetisch ungünstiger ist als in Vergleichslipiden. Dies könnte seine Ursache in verbesserten Van-der-Waals-Interaktionen infolge eines höheren Ordnungszustandes über die gesamte Acylkette oder einen Teil von ihr haben. Denkbar wäre aber auch infolge der großen Cyclohexanringe und von ihr ausgehender kinetischer Hemmung eine 'gefrorene Unordnung', die wesentlich nur die Fluidität der Membran herabsetzt. Wenn auch Monolayer- und andere Daten eher für einen höheren Ordnungsgrad sprechen, müssen erst kommende Strukturuntersuchungen, etwa mit Röntgenstrahlen, NMR, ESR, dieses Problem klären.

3.4.3.2. PC/Triterpenoid-Mischsysteme

Die für Liposomenversuche relativ großen Substanzmengen machten es nötig, in PC/Hopanoid-Mischsystemen von dem bisher durchgängig benutzten THBH auf das leichter in größeren Mengen zu isolierende Diplopterol umzusteigen. Obwohl dadurch kein völlig in sich konsistentes Bild entsteht, zeigen die Ergebnisse doch wesentliche Hopanoideigenschaften, da das gegen THBH nur im Seitenarm veränderte Diplopterol eine starke Molekülverwandtschaft mit THBH besitzt, wie an der weitgehenden Äquivalenz von Hopanmonol (1-Hydroxyethan-29-hopan), dem Oxidationsprodukt von THBH und Diplopterol (22-Hydroxy-28-hopan) in BLM - Untersuchungen gezeigt wurde (BENZ et al., 1983).

Die Wirkung von Cholesterin auf PC-Liposomen im flüssig-kristallinen Zustand wird in einer konzentrationsabhängigen Reduzierung der Permeabilität und einer Einschränkung ihrer Temperaturabhängigkeit beschrieben. Beides hat seine Ursache in einer größeren Packungsdichte und verminderter Acylkettenbewegung infolge verbesserter Van-der-Waals-Interaktionen (DEMEL, DE KRUYFF, 1976; JAIN, 1975; CHAPMAN, 1975; FRANKS, 1976). Im Gegensatz dazu wirkt es im kristallinen Zustand einer Membran permeabilitätserhöhend. Dieser Effekt ist für PCs und andere Lipide beschrieben (PAPAHADJOPOULOS et al., 1972; DE GIER et al., 1969; BITTMANN, BLAU, 1972); DEMEL, DE KRUYFF, 1976).

Verglichen mit den gut untersuchten Liposomen aus Ei-PC und Cholesterin (DE GIER et al., 1968 und eigene Werte) reduziert Diplopterol die Permeabilitt von Ei-PC für Glycerin bei allen vergleichbaren Konzentrationen schwächer. HGL wirkt bei niedrigen Konzentrationen ähnlich gut wie Cholesterin, deutet aber bei 20 mol% eine Effektsättigung an, die für höhere Konzentrationen wieder zu einem leichten Anstieg der Glycerinpermeabilität führt.
Beide Hopanoide sind somit in der Lage, in die Membranarchitektur von Ei-PC einzugreifen und permeabilitätsreduzierend zu wirken.

Die wesentlich schwächere Wirkung von Diplopterol gegen Cholesterin sollte einmal durch die sterischen Hinderungen der Van-der-Waals-Wechselwirkungen durch die Methylgruppen auf beiden Seiten der Ringebene bedingt sein, aber auch mit dem nur 14,2 Å langen hydrophoben Bereich des Moleküls zusammenhängen, der eine mittlere Länge zwischen dem optimal wirkenden Cholesterin (19,1 Å) und den permeabilitätsunwirksamen Androstanderivaten (8-9 Å) hat (DE KRUYFF et al., 1972; DEMEL et al., 1972b; BISSERET et al. 1983).
Die permeabilitätsreduzierende Wirkung von HGL ist für niedrige Konzentrationen erstaunlich gut. Zumindest bei 10 mol% wirkt es kaum schlechter als Cholesterin. Die Sättigung des Effektes und dessen Umkehrung liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an abnehmenden Konzentrationen von HGL in der Membran. Die Ursachen dafür könnten in einem Auskristallisieren von HGL während der Liposomenpräparation aber auch in einer schlechten Löslichkeit (LADBROOKE, CHAPMAN, 1969) von HGL in Ei-PC liegen. In diesem Fall wäre mit einer Phasenseparierung und Domänenbildung zu rechnen, ein Prozeß, der zu Defektstrukturen an den Phasenrändern führt (mit ansteigenden Permeabilitäten), wie es an geradkettigen Lipiden im Phasenübergang sichtbar wird (JAIN, 1980). Den gleichen Effekt könnten aber auch in die Membran eingelagerte Mikrokristalle aus HGL haben,die während der Präparation entstanden sind.
Gut in Einklang mit diesen Befunden stehen die BLM-Messungen von BENZ et al. (1983) an DOPC. Nach dieser Untersuchung beeinflußt Diplopterol die Mikroviskosität von DOPC schwächer als Cholesterin; HGL wirkt bei niedrigen Konzentrationen stärker auf die Membranfluidität als Cholesterin, während es für höhere Konzentrationen in der Wirkung unter der von Cholesterin liegt und eine Effektsättigung zeigt.

Daß sich qualitativ THBH nicht von Diplopterol und HGL unterscheidet, zeigten BISSERET et al. (1983) an der Wasserpermeabilität der flüssigkristallinen Phase von DMPC. THBH wirkte in diesem System permeabilitätsreduzierend, wenn auch schwächer als Cholesterin. Darüber hinaus konnte seine Fähigkeit, in ungesättigten Lipiden die Packungsdichte zu reduzieren, in Monolayermessungen an Ei-PC und E.coli-Lipiden bewiesen werden (KANNENBERG,1979).

Die Wirkung von Cholesterin auf die in der Literatur noch nicht beschriebene Glycerinpermeabilität von DCDPC gleicht der von Ei-PC, nur ist sie zu höheren Temperaturen hin versetzt. Auffällig ist, daß die für gesättigte PCs im Bereich des Phasenübergangs beschriebene permeabilitätserhöhende Wirkung (DE GIER et al., 1969) bis 5°C über dem Phasenübergang nicht gefunden wurde. Diplopterol zeigt eine beachtlich permeabilitätsreduzierende Wirkung, die bei 20 mol% etwa der Cholesterinwirkung gleich war. Eine Permeabilitätserhöhung konnte bis 5°C über dem Phasenübergang ebenfalls nicht beobachtet werden. Die unregelmäßige Erhöhung der Schwellrate für hohe Konzentrationen kann sinngemäß wie die Effekte von HGL in Ei-PC interpretiert werden. HGL verhielt sich bei niedrigen Konzentrationen neutral in der Glycerinpermeation, bei mittleren Konzentrationen zeigte sich nur eine schwache Reduzierung, während höhere Konzentrationen leicht die Permeation erhöhten. Das Ergebnis kann nur zurückhaltend beurteilt werden, da bei dem beobachteten starken Kristallkörper im Präparat unklar ist, wieviel HGL in die Membran integriert wurde. Allerdings deutet sich eine nur begrenzte Löslichkeit von HGL in DCDPC und eine nur bescheiden ausgeprägte Fähigkeit von HGL , verfestigend in die Membranstruktur von DCDPC einzugreifen, an.
In der Wirkung der Triterpenoide auf DCDPC legen die Permeabilitätsergebnisse, ähnlich den Monolayerergebnissen, den Schluß nahe, daß die Wirkung in DCDPC mit der Eintauchtiefe des starren Ringgerüstes korreliert. Die erstaunlich reduzierten Permeabilitäten durch Diplopterol, dessen Ringgerüst verglichen mit THBH und HGL um etwa 4 Å zur Interphase verschoben ist, könnten damit zusammenhängen, daß a) das Hopanoidgerüst nun mit den weiter zur Interphase liegenden Teilen der Acylketten interagiert oder b) daß das Hopanoidgerüst aus den 4 Å tiefer liegenden Bereichen verschwunden ist. Zumindest die überaus mäßige Wirkung von HGL spricht für letzteres. Einen interessanten Befund liefern in diesem Zusammenhang BENZ

et al. (1983). Von ihnen wurde die Translokationsrate eines Kationkomplexes in DCDPC in Anwesenheit von Diplopterol und Hopanmonol untersucht. Hopanmonol trägt nur eine Hydroxylgruppe, ist aber im hydrophoben Bereich (Länge: 18,4 Å) mit THBH und HGL identisch, wenn man in letzterem die Acylkette wegläßt. Die Translokationsrate wurde erheblich stärker von Diplopterol erniedrigt als von Hopanmonol, d.h. daß die Mikroviskosität der Membran wesentlich stärker durch Diplopterol als durch Hopanmonol gesenkt wird, ein Befund, der sehr gut mit den Permeabilitäts- und Monolayerergebnissen übereinstimmt. Nach dieser Vorstellung wird der starke Cholesterin-Effekt dann erklärbar, wenn man von einem beweglich bleibenden Isooctanarm ausgent (STOFFEL et al., 1974), so daß die Länge des rigiden Molekülteiles bei 10 Å liegt. Es ist ein reizvoller Gedanke, daß die oben schon einmal aufgeworfene Frage nach der Ordnung der "Diffusionsbarriere DCDPC" etwas mit dem hydrophoben Bereich zwischen 14,2 Å - der Länge des hydrophoben Bereichs,mit der Diplopterol die Permeabilität reduziert - und 18,4 Å - der hydrophoben Länge, mit der HGL neutral oder permeabilitäserhöhend wirkt - zu tun hat. Da in diesem Bereich die Cyclohexanringe liegen, spricht aus meiner Sicht einiges dafür, daß diese in DCDPC einen wie auch immer geartaten Ordnungszustand aufbauen, in den HGL, möglicherweise wegen der nicht abgestimmten Kettenlänge von DCDPC, nur schlecht eingreifen kann. Mit der ebenfalls oben angesprochenen "eingefrorenen Unordung" in DCDPC scheint mir die schlechte Wirkung von HGL nicht erklärbar.

DEMEL, DE KRUYFF (1976) diskutierten auch im Zusammenhang mit den permeabilitätsregulierenden Eigenschaften von Cholesterin ein notwendiges Strukturintenvar, das wiederum aus der 3 β-OH-Gruppe, der planaren Konfiguration des Sterolgerüstes und dem intakten Seitenarm bestehen soll. Die Permeabilitätsreduzierung durch Diplopterol und HGL legen den Schluß nahe, daß das notwendige strukturelle Inventar weiter gefaßt werden muß und eher in einem hydrophilen Kopf einer planaren Ringstruktur und einer Mindestlänge des hydrophoben Bereichs von 10 Å besteht. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß am speziellen Sterolgerüst die Strukturnotwendigkeiten für eine befriedigende Wirkung sehr viel enger sind (LALA et al., 1978; YEAGLE et al., 1977).

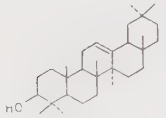
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Hopanoide (Diplopterol,HGL) ebenfalls wie Cholesterin die Fähigkeit besitzen, in der flüssig-kristallinen Phase von Lipidsystemen die Permeabilität von Nichtelektrolyten zu reduzieren.

Der quantitative "Cholesterineffekt" von Hopanoiden war in den untersuchten Lipidsystemen geringer als der von Cholesterin.
Daneben zeigte sich, daß DCDPC eine wesentlich verringerte Pemeabilität oberhalb des Phasenübergangs gegen infrage kommende Vergleichssysteme ausweist und danach in seiner Molekülstruktur so etwas wie einen "eingebauten Cholesterineffekt" besitzt.

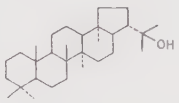
Insgesamt harmonieren die Ergebnisse an den Liposomen mit denen am Monolayer. Der Schluß scheint daher erlaubt, daß die im Monolayer gefundenen Kondensationen mit einer permeabilitätsreduzierenden Wirkung auf die Barrierefunktion der Membran korrelieren, zumindest für Nichtelektrolytmoleküle.

3.5. Versuche mit Mycoplasma

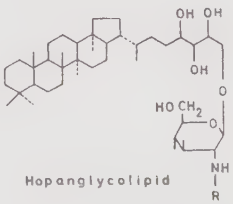
Mycoplasmen zeichnen sich unter den Prokaryoten durch das Fehlen einer Zellwand und intracytoplasmatischer Membranen aus (RAZIN, 1978). Darüber hinaus benötigen sie ein Sterol als Wachstumsfaktor in einem äußerst komplexen Medium (EDWARD, FITZGERALD, 1951; RAZIN, 1973; RAZIN, ROTTEM, 1976).
Die Sterolabhängigkeit wird von pflanzlichen und tierischen Sterolen befriedigt. Daneben wiesen ODRIOZOLA et al. (1978) im Mycoplasma capricolum nach, daß außerdem α-Amyrin, ein pentacyclisches Triterpenoid, das Wachstum fördert.



β-Amyrin



Diplopterol



Hopanglycolipid

Die cholesterinanaloge Wirkung von Hopanoiden in Lipidsystemen (PORALLA et al., 1980; BISSERET et al., 1983) und deren strukturelle Verwandtschaft mit β-Amyrin legten es nahe, die wachstumsfördernde Wirkung auch von Hopanoiden in Mycoplasmen zu testen. Als Testorganismus wurde Mycoplasma mycoides, ein enger Verwandter von Mycoplasma capricolum, verwendet.

3.5.1. Hopanglycolipid-Versuche

Der Versuch, Mycoplasma mycoides auf HGL, als Ersatz für Cholesterin, wachsen zu lassen, schlug in Cholesterin-adaptierten und -unadaptierten Stämmen von Mycoplasma mycoides fehl.
Der Versuch einer HGL-Adaptierung mit konstanten HGL-Konzentrationen und abnehmenden Cholesterin-Konzentrationen war ebenfalls erfolglos. Es wurde Wachstum beobachtet, solange noch Cholesterin im Medium war, das aber ohne Cholesterin-Supplement selbst nach einer Serie von 25 Passagen mit abnehmenden Cholesterin-Konzentrationen zum Erliegen kam.
Zur Klärung der Frage, ob überhaupt ein Effekt von HGL auf das Wachstum ausgeht, wurde der Einfluß von HGL bei gleichzeitiger Gabe von Cholesterin im Biophotometer studiert.

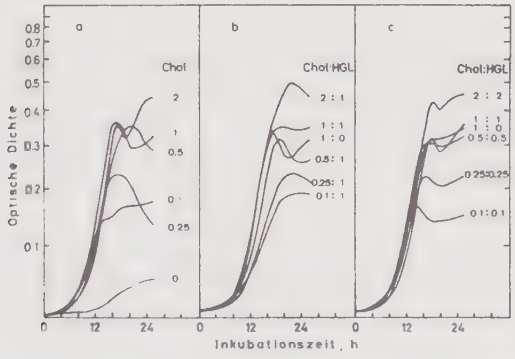


Abb. 48: Wachstum von Mycoplasma mycoides bei verschiedenen Konzentrationen von Cholesterin (Chol) und Cholesterin/Hopanglycoplipid (HGL): a) die Abhängigkeit von Cholesterin, b) und c) der Wachstumsverlauf bei gleichzeitigem Angebot von Cholesterin und HGL; die Zahlen hinter den Kurven geben relative molare Konzentrationen an; 1 entspricht 3,3 µg/ml Cholesterin und 8,1 µg/ml Hopanglycolipid

Abb. 48a gibt die Abhängigkeit von M. mycoides von der Cholesterin-Konzentration wieder.Es wird ersichtlich, daß ohne Cholesterin lediglich schwaches Wachstum erfolgt, während steigende Gaben an Cholesterin den Wachstumsertrag der Kultur erhöhen, aber keinen Einfluß auf die Wachstumsrate haben.
Abb. 48b zeigt die Wachstumskurven von Mycoplasma mycoides mit konstanter HGL-Konzentration und abnehmenden Cholesterin-Konzentrationen. Während der Wachstumsertrag der Kultur unbeeinflußt bleibt, wird die Wachstumsrate mit abnehmenden Cholesterin-Konzentrationen ebenfalls kleiner.
Aus Abb. 48c wird ersichtlich, daß bei äquimolarer Reduzierung von HGL und Cholesterin die Wachstumsrate auch in diesem Versuch unbeeinflußt bleibt.

3.5.2. Diplopterol-Versuche

Abb. 49a zeigt, daß Diplopterol bereits in geringen Konzentrationen einen leicht fördernden Effekt auf den Wachstumsertrag und die Wachstumsrate, verglichen mit der supplementfreien Probe, hat. Höhere Konzentrationen an Diplopterol wirken sich nur noch schwach auf den Wachstumsertrag aus.

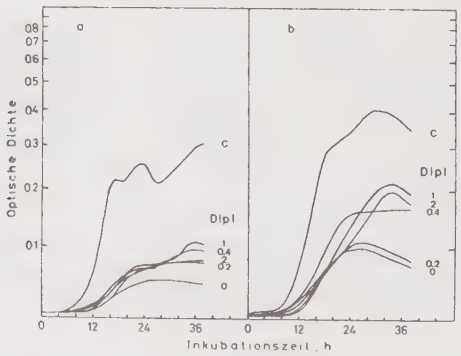


Abb. 49. Der Effekt von verschiedenen Konzentrationen an Diplopterol auf das Wachstum von Mycoplasma mycoides; a) unadaptierte Kultur, b) adaptierte Kultur: in b) wurde mit 0,5 ml aus der 48 h alten Kultur von a) angeimpft (Diplopterol-Konzentration 0,4); die Zahlen geben relative Diplopterol-Konzentrationen an; 2 entspricht einer Konzentration von 22,0 µg/ml Diplopterol; C entspricht 3,3 µg/ml Cholesterin, Dipl. = Diplopterol

Wurde der Versuch mit einer diplopteroladaptierten Kultur durchgeführt, wurden wesentlich höhere Wachstumserträge gemessen (Abb. 49b). Erstaunlich war, daß auch die supplementfreie Kultur schon einen Anpassungseffekt zeigte.

Nach KAHANE, RAZIN (1977) und RAZIN et al. (1980) sind PC-Liposomen gute Cholesterin-Donatoren für Mycoplasmen in einem Prozeß, bei dem zumindest Teile der Liposomen in die Mycoplasmenmembran integrieren. Es lag nahe, Diplopterol in Liposomen zu "verpacken", um auf diese Weise eine Wachstumsförderung in Mycoplasmen zu erreichen.

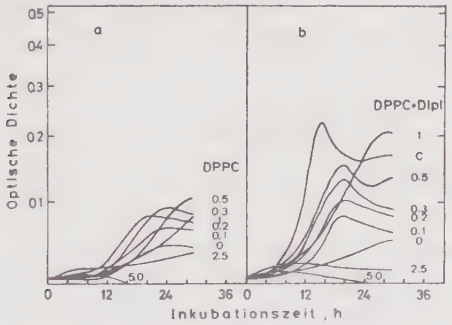


Abb. 50: Wachstum von Mycoplasma mycoides bei verschiedenen Konzentrationen von a) DPPC-Liposomen und b) DPPC-Diplopterol-Liposomen: die Zahlen in a) entsprechen relativen Konzentrationen an DPPC (1 = 7,6 µg DPPC/ml), die Zahlen in b) geben die relativen Konzentrationen der äquimolaren Mengen an DPPC und Diplopterol an (1 entspricht 4,4 µgDipl/ml und 7,6 µgDPPC/ml); c = 3,3 µg Cholesterin/ml; Dipl = Diplopterol.

Abb. 50a zeigt, daß bereits reine DPPC-Liposomen eine Wachstumsförderung bei niedrigen Konzentrationen bewirken, während höhere Konzentrationen offenbar eine rasche Lyse der Zellen bewirken.

Eine erhebliche Verbesserung von Wachstumsertrag und -rate wurde mit Liposomen erhalten, die äquimolar aus Diplopterol und DPPC aufgebaut waren. Höhere Liposomenkonzentrationen führten ebenfalls zu Zellyse (Abb. 50b).

3.5.3. Komplexierungsversuch mit Herbicolin

Das von WINKELMANN, ADAM (1980) beschriebene Acylpeptidantibiotikum Herbicolin hat ein antifungisches Wirkungsspektrum offenbar aufgrund einer Cholesterin-komplexierenden Eigenschaft (WINKELMANN, persönliche Mitteilung).
Im Plattendiffusionstest war es möglich, die wachstumshemmende Wirkung von Herbicolin durch Cholesterin-Komplexierung durch steigende Gaben an Cholesterin wieder aufzuheben. Die erhoffte gleiche Wirkung durch HGL konnte nicht erzielt werden.
Der Versuch deutet auf eine stereospezifische Komplexbildung hin, deren Anforderungen von HGL nicht erfüllt werden.

3.5.4. Diskussion der Versuche mit Mycoplasma

Allen physikalischen Membranmodellen gemein ist, daß sie zwar Aussagen über das Zusammenspiel und die Wechselwirkungen von Membranbausteinen liefern, daß die physiologische Relevanz für einen Organismus aber letztlich unbewiesen bleibt. Im Gegensatz dazu wird die physiologische Bedeutung eines Einflusses im biologischen Modellsystem (etwa Mycoplasma oder Mutanten) unmittelbar verfolgbar, aber aufgrund des Komplexitätsgrades schon einer so einfachen Membran wie die der Mycoplasmen ist die Interpretation der Effekte und ihr kausales Verständnis wesentlich erschwert.

Bei optimalen Kulturbedingungen bestehen 25-35% der Mycoplasmen-Membranen aus Phospholipiden (PG, DPG), Glycolipiden (z.B. Glycosyldiacylglycerol), Sterolen (Cholesterin) und geringen Mengen an neutralen Lipiden (Glyceride und freie Fettsäuren) (ROTTEM, 1980; SMITH, 1968).
Zum Aufbau dieser Lipidphase benötigt Mycoplasma mycoides neben Sterol noch Fettsäuren im Medium. Sterole und Fettsäuren kann es weder synthetisieren noch verändern (Übersichtsartikel: RODWELL, MITCHEL, 1979).

Wegen dieser Abhängigkeiten ist Mycoplasma mycoides ein viel benutztes biologisches Modell zur Klärung von Fragen der Membranfunktion und -synthese.
So konnte an Mycoplasmen erstmals ein direkter Beweis für die Bedeutung der Membranfluidität für das Wachstum des Organismus (MCELHANEY, 1974)

und der Existenz von Phasenübergängen geführt werden (STEIM et al., 1969). Nach MCELHANEY (1974) müssen mindestens 10% der Membranlipide in flüssigkristallinem Zustand sein, um noch Wachstum zu ermöglichen. Von ROTTEM et al. (1973) wurde direkt die von CHAPMAN (1966) und von ROTHMAN, ENGELMAN (1972) postulierte Rolle von Cholesterin als Fluiditätsregulierer bewiesen.

Befunde der letzten Jahre zeigten, daß Mycoplasmen eine große Zahl von unphysiologischen Strukturisomeren und Derivaten von Cholesterin und verwandte Ringgerüste in die Membran einbauen (SMITH, 1964; RODWELL, 1963; SMITH, 1962; ODRIOZOLA et al., 1978; DAHL et al., 1980a,b).

Die Cholesterin-Aufnahme korreliert mit der membrangebundenen Menge an Phospholipid (RAZIN, 1974) und wird von der Fluidität kontrolliert (RAZIN, 1978; WIESLANDER et al., 1981). Wegen dieser Befunde wurden die von ODRIOZOLA et al. (1978) benutzten Kulturbedingungen übernommen, bei denen Mycoplasma capricolum eine Wachstumsstimulierung durch ß-Amyrin erfuhr.

Ein Effekt von HGL ist nur indirekt zu erschließen (Abb. 48), da die Membranzusammensetzung und die Mikroviskosität nicht bestimmt wurden. Sicher ist, daß es nicht als Ersatz für Cholesterin in der Membran wirken kann.
Die bei der Gabe mit Cholesterin beobachtete Wachstumshemmung läßt sich verschieden erklären. Einmal kann man von einer Aufnahme von HGL in die Membran ausgehen und die Wachstumshemmung als Effekt von Defektstrukturen oder Desorganisation durch HGL interpretieren. In diesem Fall sollten auch die Wachstumserträge der Kulturen verändert sein. Deren Konstanz macht diese Möglichkeit zumindest unwahrscheinlich.
Der Effekt könnte aber auch durch eine schlechtere Verfügbarkeit von Cholesterin zustande kommen. Die Cholesterin-Übertragung wird als physikalische Adsorption von lipophilen Partikeln auf die Mycoplasmen-Membran beschrieben, deren Aktivierungsenergie bei 6 kcal/mol liegt (CLEJAN et al., 1978; GERSHFELD et al., 1974). Bei der im Monolayer- und Permeabilitätsanteil bewiesenen Fähigkeit von HGL, durch starke Van-der-Waals-Wechselwirkungen auf die Lipide kondensierend zu wirken, liegt der Gedanke nahe, daß durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen HGL und Cholesterin in den lipophilen Partikeln die Aktivierungsenergie für die

Cholesterin-Adsorption soweit erhöht wird, daß eine verlangsamte Wachstumsrate sichtbar wird. Die durch äquimolare Mengen an HGL und Cholesterin zwischen ihnen herabgesetzten Molekülkontakte könnten der Grund für die Aufhebung der Hemmung bei diesem Versuch sein.
Bei dieser Interpretation bleibt die Frage, warum HGL nicht in die Membran integriert wird? Da HGL viele polare Gruppen besitzt, wird es fester an den hydrophilen Bereich der Interphase binden. Die daher für den beschriebenen Adsorptionsprozeß zwangsläufig höhere Aktivierungsenergie kann der Grund dafür sein, daß HGL nicht in die Mycoplasmen-Membran integriert.

Diplopterol gleicht mit nur einer Hydroxylgruppe dem Cholesterin-Molekül wesentlich stärker. Wie im Monolayerteil diskutiert, ist die physikalische Instabilität des Films ein Hinweis auf die nur schwächer ausgebildeten Molekülwechselwirkungen. Neben der strukturellen Verwandtschaft mit ß-Amyrin ließ auch dieses energetische Argument eine Wachstumsförderung durch Diplopterol erwarten.
Zum Verständnis der Diplopterol-Wirkung ist eine kurze Erläuterung des Cholesterin-Effektes notwendig. Die Cholesterin-Funktion sahen eine Reihe von Autoren an ein notwendiges, strukturelles Molekülinventar gebunden, das aus einer trans-Bindung zwischen dem A und dem B Ring des Steroidgerüstes, einer äquatorialen Hydroxylgruppe (ß- OH-Gruppe) und einer verzweigten, mindestens 8 C-Atome langen aliphatischen Seitenkette (ROTTEM et al., 1971; ARCHER, 1975) bestehen sollte. Diese Anforderungen treffen sich mit dem geforderten molekularen Inventar für Regulatoren der Fluidität und Permeabilität der eukaryotischen Membran (DEMEL, DE KRUYFF, 1976) und werden in erster Linie von Cholesterin selbst befriedigt.

Mit der Wachstumsförderung durch ß-Amyrin und anderen Cholesterin-Strukturverwandten wurde von ODRIOZOLA et al. (1978) gezeigt, daß weder eine freie Hydroxylgruppe, noch eine all-trans-Konfiguration des Ringgerüstes und auch kein aliphatischer Seitenarm notwendige Strukturmerkmale sein müssen.
Diese Widersprüche löst die folgende kurze Liste an Befunden auf, die auch zu der augenblicklich akzeptierten Rolle von Cholesterin in der Mycoplasmen-Membran führt: a) Suboptimales Wachstum von Cholesterin-Derivaten und Cholesterin-Abkömmlingen korreliert oft mit vermindertem Einfluß auf die Membranviskosität (LALA et al., 1978; DAHL et al., 1980a); b) Moleküle wie Lanosterol und ß-Amyrin fördern das Wachstum, ohne Einfluß auf die Membranviskosität und -permeabilität auszuüben, aber schwächer

als Cholesterin (ODRIOZOLA et al., 1978; DAHL et al., 1980b); c) Lanosterol - ohne Einfluß auf die Membranviskosität - hat zusammen mit membranunwirksamen Mengen an Cholesterin einen synergistischen Effekt auf das Wachstum (BLOCH, 1981; DAHL et al., 1981). Die sich daraus ergebenden Cholesterin-Funktionen werden wie folgt beschrieben:

1) Regulation der Membranfluidität und -permeabilität. Diese Funktion stellt hohe Ansprüche an den sterischen Aufbau und wird optimal durch Cholesterin erfüllt (RAZIN, 1975).

2) Eine mehr primitive Funktion der Kopfgruppen- oder Ladungstrennung durch das voluminöse, hydrophobe Gerüst: "Spacerfunction"; sie ist weitgehend unspezifisch in ihren sterischen Anforderungen (ODRIOZOLA et al., 1978; YEAGLE et al., 1977).

3) Eine Kontrollfunktion der Phospholipidbiosynthese, scheinbar über die Regulation der Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren; die Funktion ist stereospezifisch (DAHL et al., 1981).

Abb. 49 zeigt, daß unadaptierte Mycolplasmen-Stämme bereits eine geringe Wachstumsförderung durch Diplopterol erfahren, während Diplopterol-adaptierte Stämme den Effekt wesentlich verstärkt aufweisen. In beiden Versuchen blieb das Wachstum aber unter dem von Cholesterin. Auffällig war außerdem, daß die supplementfreie Kultur ebenfalls eine signifikante Adaptierung zeigte.
Aus der Wachstumsförderung kann man schließen, daß Diplopterol in die Membran integriert wurde. Außerdem liegt der Schluß nahe, daß es die von YEAGLE et al. (1977) und ODRIOZOLA et al. (1978) diskutierte unspezifische "spacer"-Funktion von Cholesterin erfüllt.
Von ARCHER (1975) und ROTTEM et al. (1973) wurde nachgewiesen, daß Mycoplasma mycoides auf reduzierte Cholesterin-Gaben mit einer Anpassung der Membran im Fettsäuremuster und in der Zusammensetzung der Kopfgruppen reagiert.
Das verbesserte Wachstum in den Diplopterol-freien Kulturen weist diese Anpassung unmittelbar aus. Das mit Diplopterol gefundene, verbesserte Wachstum sollte daher auf die Anpassung der Lipidzusammensetzung und die unspezifische "spacer"-Funktion von Diplopterol zurückgehen.

KAHANE, RAZIN (1977) und RAZIN et al. (1980) zeigten, daß PC-Liposomen effektvolle Cholesterin-Donatoren sind, in einem Prozeß, bei dem zumindest Teile der Liposomen sich in die Mycoplasmen-Membran integrieren. Die Überlegungen von GERSHFELD et al. (1974) über die verbesserte Cholesterin-Aufnahme durch Tween 80 machen es sehr wahrscheinlich, daß dieser Aufnahmemechanismus weniger Energie benötigt. Es wurde daher der naheliegende Versuch unternommen, die Diplopterol-Aufnahme durch Liposomen zu steigern.
Abb. 50a zeigt, daß Mycoplasma mycoides auf reine DPPC-Liposomen mit verbesserten Wachstumseigenschaften reagiert. Der Effekt ist konzentrationsabhängig und führt oberhalb einer kritischen Liposomenkonzentration zu schneller Zellyse der Kulturen.
Diese Beobachtung steht im Einklang mit SMITH, BOUGHTON (1960), die aufgrund der Oberflächeneigenschaften von PCs eine lytische Aktivität beschrieben, die oberhalb einer kritischen Konzentration zu rascher Zellyse führte. Die Wachstumsförderung unterhalb dieser Konzentration dürfte Ausdruck des vermehrten Einbaus von geradkettigem DPPC und seiner fluiditätssenkenden Wirkung sein.
Bis zu der kritischen Oberflächenkonzentration an Liposomen wurde eine Wachstumsförderung durch Diplopterol gefunden. Die Größe des Effektes auf diese Diplopterol-unadaptierten Stämme war gleich dem von gelöstem Diplopterol auf adaptierte Mycoplasmen, so daß tatsächlich dieses Donorsystem eine Verbesserung der Aufnahme bewirkt.

Die Befunde legen also nahe, daß Diplopterol von den postulierten Cholesterin-Funktionen lediglich die unspezifische "spacer"-Funktion erfüllen kann. HGL scheint nicht in die Mycoplasmen-Membran zu integrieren.
Diese Versuche sind natürlich kein Beweis für die Integration von Diplopterol in die Mycoplasmen-Membran. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß Diplopterol einen Einfluß auf die Membranviskosität hat. Dies können erst Membrananalysen und Viskositätsmessungen an isolierten Membranen erweisen.

Es ist in sich schon eine erstaunliche Tatsache, daß diese Organismen überhaupt auf diese stark unphysiologischen Membrankomponenten reagieren können. Hier scheint die Lebensweise der Mycoplasmen in Wirtsorganismen mit wechselndem Nährstoffangebot eine adaptive Potenz evolviert zu haben, die eine wesentlich weitere Bandbreite an Membrankomponenten erlaubt, als

sie bei vielen anderen Prokaryoten zu finden ist. RAZIN (1982) meint in diesem Zusammenhang, daß die auch unter Mycoplasmen unübliche Akzeptanz von Molekülen wie β-Amyrin auf Mycoplasma capricolum beschränkt sei. Die Befunde in dieser Arbeit legen es nahe, daß auch mindestens die verwandte Spezies Mycoplasma mycoides über das bisher bekannte Spektrum hinaus ungewöhnliche Moleküle integrieren kann.

Sei abschließend noch erwähnt, daß die Fähigkeit von α- und β-Amyrin und Hopanabkömmlingen, in Fremdmembranen sinnvoll zu integrieren, nicht auf Mycoplasmen beschränkt zu sein scheint. So konnten NES, PATTERSON (1981) zeigen, daß α- und β-Amyrin und Hop-22 (29)-ene zum Teil unter Wachstumsförderung in die Membran von Phytopthora cactorum, einem zur Epoxidierung von Squalen unfähigen Pilz, integrieren können.

4. ABSCHLUSSDISKUSSION

Bei den untersuchten Phospholipiden handelt es sich um 1,2-Dipalmitoyl-phosphatidycholin (DPPC), 1,2-Diisoheptadecanoyl-phosphatidylcholin (DIHPC), 1,2-Dianteisoheptadecanoyl-phosphatidylcholin (DAHPC) und 1,2-Di-ω-cyclohexyldodecanoyl-phosphatidylcholin (DCDPC).

Die untersuchten Phospholipide tragen alle den gleichen hydrophilen Kopf (Phosphatidylcholin) und wurden im hydrophoben Teil des Moleküls nach der Länge der Kohlenwasserstoffketten ausgewählt. DPPC, DIHPC und DAHPC tragen Acylketten, die in der all-trans-Konfiguration gleich lang sind. DPPC hat in der Acylkette gegen DIHPC und DAHPC ein C-Atom weniger. Mit einer 0,8 Å kürzeren Kette, verglichen mit DPPC ist DCDPC um etwa den gleichen Betrag kürzer, den eine um ein C-Atom längere Acylkette (DCTPC) länger als DPPC wäre (0,5 Å). Von der Kettenlänge stellt DCDPC zudem eine mittlere Länge der beiden physiologischen Kettenlängen $C_{17:0}$ und $C_{19:0}$ aus Bacillus acidocaldarius dar (DE ROSA et al., 1974; LANGWORTHY et al., 1976).

Bei gleichem Lipidkopf werden die kohäsiven Kräfte zwischen den Molekülen wesentlich von den London-Van-der-Waals Kräften zwischen den Acylketten determiniert (VAN DEENEN, 1965). Dadurch bedingt sind die thermodynamischen Daten empfindlich auf Veränderungen in den Acylketten (LADBROOKE, CHAPMAN, 1969). Der gewählte experimentelle Ansatz erlaubt daher, über den Einfluß der untersuchten PCs auf die thermodynamischen Daten, eine Beurteilung der physiologischen Leistungen dieser Lipide.

Bei den untersuchten Hopanoiden handelt es sich um 1,2,3,4-Tetrahydroxy-pentan-29-hopan (THBH), 1-(O-6-N-Acylglucosaminyl)-2,3,4-tetrahydroxy-pentan-29-hopan (HGL) aus Bacillus acidocaldarius und um 22-Hydroxy-29-hopan (Diplopterol) aus Methylobacterium organophilum. Hopanoide gehören zur Klasse der pentacyclischen Triterpenoide.
Aus dem Einfluß von Hopanoiden auf das physikalische Verhalten der Modellmembranen wird die physiologische Bedeutung der untersuchten Moleküle für die Bakterienmembran verständlich.

4.1. PCs mit iso- und anteiso-Verzweigung

Lipide mit iso- und anteiso-Verzweigung unterschiedlicher Kettenlänge sind häufige Membranbestandteile in Prokaryoten, vor allem in gram$^+$-Bakterien (KANEDA, 1977).
Ihre Bedeutung für die Cytoplasmen-Membran wurde bisher vor allem in biologischen Experimenten ersichtlich, in denen man z.B. in Bacillus stearothermophilus als Antwort auf Temperaturerhöhung eine Erniedrigung des Gehalts an verzweigten Fettsäuren fand (REIZER, 1978).
Aus den erniedrigten Phasenübergängen in künstlichen und angereicherten natürlichen Membranen aus iso- und anteioso-Fettsäuren, verglichen mit den geradkettigen Homologen, schloß man, daß diese Lipide als "Membranfluidizierer" operieren (SILVIUS, MCELHANEY, 1980; BLUME et al., 1978; SILVIUS et al., 1980a).

Daten über den Flächenbedarf der untersuchten Moleküle in Membranen existierten bislang nicht und aus Studien über das thermodynamische Verhalten war nur die Phasenübergangstemperatur bekannt (SILVIUS, MCELHANEY, 1979a,b).

Für die iso-Verzweigung in DIHPC erbrachten die Untersuchungen eine Absenkung des Phasenübergangs gegen DPPC, aber einen nur relativ schwachen Einfluß auf die Übergangsenthalpie. Der molekulare Flächenbedarf war nur in der kondensierten Phase größer als der von DPPC.
Durch die anteiso-Verzweigung in DAHPC wurden der Phasenübergang und die Übergangsenthalpie - Vergleichslipid wiederum DPPC - wesentlich stärker abgesenkt, als durch DIHPC. Der molekulare Flächenbedarf in der flüssig-expandierten Phase lag nur geringfügig über dem von DPPC und in der flüssig-kondensierten Phase über dem von DIHPC.
Die Befunde zeigen, daß die verzweigten Acylketten der Lipide in der Gelphase schlechter gepackt sind und entsprechend den dadurch zu erwartenden verschlechterten London-Van-der-Waals-Wechselwirkungen, einen erniedrigten Phasenübergang mit geringerer Übergangsenergie haben.
Quantitativ bleiben die Wirkungen auf die erbrachten Daten allerdings erheblich hinter denen der cis-Doppelbindung in Acylketten.
Bestätigt werden die Ergebnisse durch Röntgenweitwinkelmessungen an angereicherten natürlichen Membranen von E.coli, B.subtilis und Staphylococcus aureus, die die übliche scharfe 4,2 Å Reflektion in der Gelphase nicht mehr zeigen und dafür breitere Brechungsbanden bei 4,3 - 4,4 Å (HAEST et al.,

1974; LEGENDRE et al., 1980; SILVIUS, MCELHANEY, 1980). Außerdem konnten die sonst zu beobachtenden Partikelaggregationen in der Gelphase von Membranen mit verzweigten Lipiden nicht gefunden werden (HAEST et al., 1974, SILVIUS, MCELHANEY, 1980).
Etwas verwirrend ist der Befund, daß sich in der flüssig-expandierten Phase die Verzweigungen, verglichen mit DPPC, nicht oder im Falle der anteiso-Verzweigung nur geringfügig flächenerhöhend auf die molekulare Packung auswirken. Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß zwar infolge behinderter Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Acylketten das Temperaturintervall der flüssig-kristallinen Phase verbreitert wird, daß aber die Mikroviskosität, mithin die Fluidität nicht wesentlich verändert wird.

In diesem Zusammenhang sind die Beobachtungen von GLIOZZI et al. (1982) interessant, der eine reduzierte Beweglichkeit eines Kationkomplexes in BLM-Membranen aus Lipiden mit verzweigten Acylketten fand, ein Befund, der auf eine höhere Fluidität schließen läßt. Andererseits läßt sich aus den erhöhten Permeabilitäten für Nichtelektrolytmoleküle in Liposomen aus angereicherten iso- und anteiso-Acholeplasma laidlawii-Lipiden auf eine erhöhte Fluidität der Zellmembran schließen (MCELHANEY et al., 1973).

Die vorliegende Untersuchung kann diese Frage nicht klären. Den Einfluß auf die Membranfluidität können erst Studien erbringen, die direkt die Fluidität mit geeigneten Sonden messen.

Insgesamt bestätigen aber die Befunde die Interpretation, daß, verglichen mit geradkettigen Homologen, iso- und anteiso-Verzweigungen sich fluidisierend in der Membran auswirken (SILVIUS, MCELHANEY, 1972a,b; KANNENBERG et al., 1983).
Quantitativ ist, wie Kalorimeter und Monolayerdaten zeigen, die Wirkung der iso-Verzweigung bedeutend schwächer als die der anteiso-Verzweigung. Dem kommt insofern physiologische Bedeutung zu, als der Zelle damit ein "Grobtrieb" und ein "Feintrieb" im Regulationsmechanismus der Fluidität zur Verfügung steht. Eine damit übereinstimmende Beobachtung, des Austauschs von anteiso- gegen iso-Fettsäuren bei Temperaturerhöhung machten RILFORS et al. (1978) in B. megaterium.

4.2. $C_{18:0}$-PC mit endständigen Cyclohexanringen

Lipide mit ω-Cyclohexanfettsäuren wurden erstmals in dem thermo-acidophilen Bacillus acidocaldarius gefunden (DE ROSA et al., 1971a,b; OSHIMO et al.,

1978). In jüngster Zeit fand sich außerdem diese ungewöhnliche Fettsäure in einer Reihe von thermo-acidophilen Bacillen aus Bodenproben (HIPPCHEN et al., 1981) und in dem mesophilen Curtobacterium pusillum (SUZUKI et al., 1981).
Aus dem Auftreten von ω-Cyclohexanfettsäuren in thermo-acidophilen Bacillen vermutete man einen Zusammenhang mit besonderen Moleküleigenschaften, die die Thermoadaptierung mitbegründen sollte (BLUME et al., 1978); in einer kritischen Würdigung des Forschungsstandes kommt LANGWORTHY (1982) aber zu dem Schluß, daß die Ergebnisse widersprüchlich sind und die Funktion dieser Lipide noch unklar ist.

DCDPC wurde mit den dargestellten Methoden erstmals untersucht. Die kalorimetrischen Untersuchungen an DCDPC-Liposomen erbrachten einen Phasenübergang bei 13,8°C, der aus zwei sich überlagernden Energieschritten geringerer Übergangsenthalpie zusammengesetzt war. Im Monolayer wurde kein Phasenübergang gefunden, sondern eine lineare Temperaturabhängigkeit. Der Monolayerfilm hatte, zumindest bei niedrigen Temperaturen, kondensierten Charakter. Die Permeabilitätsmessungen waren in doppelter Hinsicht überraschend: a) Im Phasenübergangsbereich zeigten sie nicht den sonst üblichen Anstieg in den Permeabilitätsraten (z.B. MARSH et al., 1976) und b): die Permeabilitätsraten oberhalb des Phasenübergangs waren erheblich niedriger als die von Lipiden mit Fettsäuren gleicher Kettenlänge.
In den Befunden zweier,gegen Vergleichslipide, energetisch enger beieinander liegender Phasenzustände und der reduzierten Permeabilität und deren verringerter Temperaturabhängigkeit treffen sich die Ergebnisse an DCDPC mit den für Cholesterin beschriebenen Wirkungen auf Lipidsysteme (DEMEL, DE KRUYFF, 1976). DCDPC besitzt daher in seinem Molekül einen eingebauten "Cholesterin-Effekt".

Die physiologisch bedeutsame Tatsache reduzierter Permeabilitäten oberhalb des Phasenübergangs, mit daraus zu folgernder erhöhter Membranfluidität (z.B. JAIN, 1980), wirft die Frage der Membranorganisation dieser Lipide auf. Da Verzweigungen an den Acylkettenenden eine fluidisierende Wirkung haben, können sie nicht in Kontinuität zu diesen gesehen werden, obwohl sie das noch voluminösere Acylkettenende tragen.
Aus den bislang bekannten Ergebnissen an DCDPC und anderen, vergleichbaren Lipiden läßt sich folgendes Doppelschichtmodell für Lipide dieses Typs konstituieren:

- Unterhalb des Phasenübergangs bilden die beiden Monolayer-Hälften der DCDPC-Doppelschicht in der Membranmitte möglicherweise einen "Reißverschluß" aus ineinandergreifenden Cyclohexanringen.
  Diese Anordnung ist wegen der üblicherweise abgewinkelten Acylkettenkonformation am C 2 des Glycerinsrückgrats von PC und der daraus folgenden Verschiebung dieses Kettenendes zur Interphase (HAUSER et al., 1981), denkbar. Die daraus zu folgernde behinderte Rotation um die Längsachse der Lipidmoleküle in der Gelphase wurde bei Glycolipidkopfgruppen, d.h. durch sterische Behinderungen der Lipidköpfe, und durch elektrostatische Wechselwirkungen von Ionen mit den Lipidköpfen bereits beobachtet (BLUME, persönliche Mitteilung). Die Cyclohexanringe könnten einen vergleichbaren Effekt im hydrophoben Bereich des Moleküls begründen.

- Der Phasenübergang ließe sich unter dieser Annahme als ein Öffnen des "Reißverschlusses" interpretieren, möglicherweise verbunden mit einer Umlagerung der Ketten oder einem teilweisen Aufschmelzen. Die Prozesse sind wenig kooperativ und der Ordnungsgrad über die gesamte Kettenlänge ändert sich nur schwächer als in Vergleichslipiden.
  Als reines Bilayerereignis würde verständlich, warum im Monolayer kein Phasenübergang sichtbar ist.

- Aufgrund von Van-der-Waals-Interaktionen und/oder kinetischer Hemmungen geht der Ordnungsgrad oberhalb des Phasenübergangs nur sehr viel langsamer verloren und die Acylkettendichte in der Membranmitte bleibt höher als die von Vergleichslipiden.
  Die Folge davon wäre, daß der Ordnungsgrad am Kettenende höher als üblich ist und die Fluidität niedriger. Unter dieser Annahme lassen sich die reduzierten Permeabilitäten erklären und die erhöhte Fluidität an BLM-Membranen (BENZ et al., 1983).

- Im Bereich zwischen den Cyclohexanringen und der Interphase (~ 14 Å tief) ist ausreichend Raum neben den Acylketten, möglicherweise eine Art "hydrophober Taschen", der Moleküle wie Cholesterin, Diplopterol oder DPH unter Erhöhung der Van-der-Waals-Wechselwirkungen aufnehmen kann.
  Diese Annahme erklärt die reduzierten Permeabilitäten durch Cholesterin und Diplopterol und die starke Cholesterin-Kondensation. Unter dieser Annahme wird auch erklärlich, warum die Monolayer-Interaktion und die

Permeabilitätsreduktion von der Moleküllänge der verwendeten Triterpenoide abhängig war. Zusammen mit dem vorgegangenen Punkt könnte die Inserierung von DPH-Molekülen in diesen Taschen auch erklären, warum Fluoreszensdepolarisationsmessungen keinen Phasenübergang auswiesen, sondern eher einen linearen Zusammenhang mit der Temperatur (DREHER, 1978; SUNAMOTO et al., 1982).

Unklar ist, ob der Befund von BENZ et al. (1983), daß DCDPC in BLM-Messungen eine hohe spezifische Kapazität zeigt, aus der auf eine vergleichsweise dünne Membran geschlossen werden kann, im Einklang mit dem entworfenen Modell steht.
Bei weitgehend aufgerichteten Ketten auch oberhalb des Phasenübergangs sollte man eher eine "dicke Membran" erwarten. Andererseits könnte durch die angenommene hohe Acylkettendichte das in BLM-Membranen vorhandene Restlösungsmittel stärker herausgequetscht werden als in Vergleichslipiden. Aus diesem Effekt würde eine "dünne Membran" resultieren.
Nicht konsistent sind die Befunde von ENDO et al. (1982), die eine Glucosepermeabilität im Phasenübergang von DCUPC und DCTPC fanden. Allerdings scheinen die Ergebnisse in sich und mit einer Paralleluntersuchung der gleichen Arbeitsgruppe von SUNAMOTO et al. (1982) nicht ganz stimmig. Oberhalb des Phasenübergangs finden aber auch sie die untersuchten Membranen glucosedicht.

JAIN (1980) betont in einer Diskussion von Permeabilitätseffekten die Bedeutung des Fluiditätsgradienten im Membraninneren, der bei vielen Lipiden sich bis zum C 10 wenig und zum Kettenende hin dramatisch ändert (SEELIG, SEELIG, 1974). Die Befunde legen nahe, daß in Lipiden mit ω-Cyclohexanfettsäuren gerade dieser Fluiditätsgradient abgeflacht ist. ω-Cyclohexanfettsäuren reduzieren damit u.a. die Wirkungen der Temperatur auf die Membranen und erhöhen deren Integrität und Funktionstüchtigkeit, etwa der Barriereeigenschaften. Damit stellen sie ein wichtiges Adaptationsinstrument der Bakterien bei Temperaturstreß dar.
Belegt wird dies auch durch noch zu diskutierende Wachstumsexperimente an B.a. und durch die Befunde von SUZUKI et al. (1981) an Curtobacterium, das als Antwort auf erhöhte Wachstumstemperatur den Anteil an Fettsäuren mit entständigen Cyclohexanringen von 25 auf über 80% der Fettsäurefraktion steigert.
Wegen der Bildung dichter Liposomen bei 37°C ist es außerdem denkbar, daß DCDPC eine angewandte Bedeutung als Lipid für Vesikel erlangt, die Pharmaka beinhalten (persönliche Mitteilung T. OSHIMA).

4.3. Hopanoide

Nach OURISSON, ROHMER (1982) gilt nach wie vor die Generalisierung, daß Prokaryoten, mit Ausnahmen von Mycoplasmen und Methylococcus, keine Sterole als Membrankomponenten enthalten.
Nach den bisherigen Untersuchungen sind aber Hopanabkömmlinge ein weit verbreiteter Membranbestandteil in Prokaryoten. Sie wurden in Cyanobakterien, Rhodospirillaceae, in Methyltrophen und in einer ganzen Reihe weiterer Bakterien gefunden (ROHMER et al., 1979; OURISSON et al., 1979; NES, HEFTMAN, 1981).
ROHMER et al. (1979) schlugen vor, daß es sich bei den Hopanoiden um phylogenetische Vorläufer des Cholesterins handelt mit analoger Funktion in der Membran.
In den kalorimetrischen Untersuchungen wirkte THBH phasenübergangslöschend und senkte die Übergangsenthalpie. Monolayerstudien zeigten, daß THBH und HGL auf alle untersuchten Lipide kondensierend wirken können. Die Permeabilität von Nichtelektrolytmolekülen wird von Diplopterol und HGL gesenkt.

Diese allesamt für Cholesterin in entsprechenden Membransystemen beschriebenen Wirkungen (DEMEL, DE KRUYFF, 1976) beweisen, daß Hopanoide zweifelsfrei cholesterinanalog in Membranen wirken können.
Gestützt wird die Interpretation auch durch Befunde von BISSERET et al. (1983), die eine reduzierte Permeabilität für Wasser in DMPC/THBH-Vesikeln fanden. Die für die reduzierten Permeabiltitäten zu fordernde erniedrigte Membranfluidität (DEMEL, DE KRUYFF, 1976) wurde von BENZ et al. (1983) direkt für Diplopterol, Hopanmonol und HGL in BLM-Lipidsystemen nachgewiesen.
DEMEL, DE KRUYFF (1976) sehen die Ursachen der Cholesterin-Effekte in einer reduzierten Acylkettenmobilität und dichteren Packung, deren eine wesentliche Ursache stereospezifische hydrophobe Interaktionen sind. In diesem Zusammenhang diskutieren sie auch ein notwendiges strukturelles Molekülinventar für die Cholesterin-Wirkung. Diese Anforderungen, in dem noch immer schlecht verstandenen Wirkungsmechanismus der Sterole (MELCHIOR, 1982), haben aber nur bedingt Gültigkeit für Hopanoide. OURISSON, ROHMER (1982) formulierten aufgrund von Kriterien der Selbstorganisation für Lipide (TANFORD, 1978), daß die Moleküle orientierbar sein müssen, d.h. sie müssen einen hydrophilen Kopf und einen lipophilen Körper besitzen. Der sollte eine Länge von etwa 15 Å haben und einen ausreichenden Querschnitt

(etwa 6 x 6 Å), um mit den Acylketten interagieren zu können. Die dargestellten Moleküldimensionen, aber mit wesentlich höherer Evidenz zeigen die Experimente, daß Hopanoiden diesen Anforderungen genügen.
Die geringeren molekularen Anforderungen an Hopanoidmoleküle haben vermutlich ihre entscheidenden Ursachen in den, verglichen mit Cholesterin, unterschiedlichen Wirkmechanismen und der verschiedenen Lokalisierung des Ringgerüstes in der Membran. Im Gegensatz zum Sterolgerüst ist das Hopanoidgerüst nicht an der Phasengrenze, sondern mehr zur Membranmitte hin inseriert. Die daraus, wegen der bedeutenden Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen, zu erwartende verbesserte Interaktion von Hopanoiden mit Acylketten, deren Ende einen verbreiterten Querschnitt tragen, konnte an DIHPC und DAHPC (iso- bzw. anteioso-Verzweigung) bewiesen werden.
Für Hopanoide zeichnen sich daher Wirkungsmechanismen ab, bei denen, anders als Sterole, die Restriktion der Acylkettenbeweglichkeit stärker das Kettenende beeinflußt. Der zur Membranmitte ansteigende Fluiditätsgradient (JAIN, 1980) sollte also durch diesen Hopanoidmechanismus flacher werden. Deren Leistungen bestehen demnach in der Restriktion und der dichteren Packung der Acylketten als ganzes, aber auch in einer stärkeren Restriktion der Acylkettenenden. Sie wirken damit der die Beweglichkeit und Fluidität der Fettsäuren erhöhenden Temperatur entgegen und sind damit ein wichtiges Instrument der Thermoadaptierung, z.B. von Bacillus acidocaldarius, das die Integrität und Funktionalität, etwa die Barriereeigenschaften für Ionen und H^+, garantiert.

Die maximalen Effekte wurden bei Hopanoidkonzentrationen gefunden, die etwa den physiologischen Konzentrationen in der Bacillus acidocaldarius-Membran entsprachen. Für höhere Konzentrationen deutet die gefundene Effektsättigung möglicherweise auf eine Phasentrennung hin, mithin auf eine begrenzte Löslichkeit der Hopanoide in den entsprechenden Lipidmembranen. Andererseits könnte die nur in DAHPC fehlende Effektsättigung ihre Ursache in einer preferentiellen Interaktion von Hopanoiden mit mehr fluiden Lipiden haben. Diese Vermutung ist für Cholesterin ein gesicherter Befund (z. B. MLECHIOR, 1982).
Erweist sich dieser Gedanke als richtig, hätten Hopanoide, über ihre membranstabilisierende Wirkung hinaus, eine wichtige Funktion in der lateralen Lipiddynamik und Domänenbildung.

Die lipidsortenspezifische Interaktion von Hopanoiden wirft die Frage auf, wie Hopanoide mit den selbst schon membranstabilisierenden ω-Cyclohexanlipiden interagieren.
Gefunden wurde eine kondensierende Wirkung von THBH in DCDPC, aber ein nur schwacher Effekt von HGL. Die Ergebnisse zeigen, daß Hopanoide die Lipidpackung auch von ω-Cyclohexanlipiden weiter erhöhen können und mit einer Erhöhung der Acylkettendichte und verstärkter hydrophober Interaktion die membranstabilisierenden Wechselwirkungen weiter stärken.
Wie im Vorabschnitt dargestellt, sprechen viele Befunde dafür, daß ω-Cyclohexanringe den Ordnungsgrad am Acylkettenende erhöhen. Die sich daraus ergebende höhere Acylkettendichte in der Kernregion der Membran läßt stärkere stereospezifische Anforderungen an Fluiditätsregulatoren erwarten.

Es ist daher denkbar, daß die kondensierende Wirkung von THBH mit ω-Cyclohexanfettsäuren, deren Kettenlänge den abgestimmten physiologischen Fettsäuren aus Bacillus acidocaldarius entsprechen ($C_{17:0}$, $C_{19:0}$), größer ist, als es mit dem einer mittleren Länge entsprechenden DCDPC der Fall war.

Zwiespältig stellt sich bisher die Rolle von HGL dar. Es zeigte nur geringe Kondensationen in DCDPC bei hohen Temperaturen und wirkte bei niedrigen Temperaturen flächenvergößernd auf die molekulare Packung.
Die Befunde könnten Folge der unphysiologischen Kettenlänge von DCDPC sein. Denkbar ist allerdings auch, daß der fluidisierenden Potenz auf geordnete Doppelschichten, wie sie HGL in DPPC und DIHPC zeigte, eine physiologische Bedeutung zukommt. So könnte das an hohe Temperaturen adaptierte Bakterium, mit einem hohen Gehalt an ω-Cyclohexanlipiden bei schnellen Änderungen im Wachstumsmilieu auf die fluidisierende Wirkung von HGL angewiesen sein, um eine allzu rigide Membranfluidität zu verhindern.
Ebenfalls nicht ausgeschlossen ist, daß die dichten ω-Cyclohexanlipide ganz das "self-assembly" mit HGL in natürlichen Membranen vermeiden. Solche Gründe führt ISRAELACHVILI (1982) für das seltene gemeinsame Vorkommen von Phosphatidylethanolamin mit Cholesterin in biologischen Membranen an. HGL könnte in diesem Fall auch eine Art Brückenfunktion zwischen den dichten ω-Cyclohexanlipiden und den mehr fluiden Domänen der Membran haben.

Neben der Funktion der Hopanoide als stabilisierende Membranbausteine legen die Mycoplasmen-Versuche den Schluß nahe, daß Hopanoide eine weitere wichtige Rolle in der Membran zufällt, indem sie die geladenen Lipidkopfgruppen trennen.

Gerade für Bacillus acidocaldarius, der an heißes, saures Milieu adaptiert ist, kann diese Funktion erhebliche Bedeutung haben. B.a. baut seine Membran zu etwa 10% der Gesamtlipide aus einem negativ geladenen Sulfonolipid auf. Der Sinn dieser negativen Oberflächenladung von B.a. könnte die starke Hydratisierung der Ladungen und ein "Schild" aus H^+-Konterionen sein. Die durch diese H^+-Ladungen mögliche selektive Ionenpermeabilität (HOPFER et al., 1970) kann als ein erster Abwehrmechanismus gegen die äußere Protonenkonzentration gesehen werden. Dieser, zum Schutze der großen Zahl an säurelabilen Esterbindungen und glycosidischen Verknüpfungen, wichtige Mechanismus, bedingt andererseits effektive Mechanismen, die die elektrostatische Abstoßung in der Kopfgruppenregion unterbindet. Wie empfindlich B.a. in dieser Region ist, zeigte KRISCHKE (1982) an einer PE^--Mutante von B.a., die erheblich stärker pH-sensitiv war, obwohl PE-Lipide nur in kaum nachweisbaren Mengen in der Wildtyp-Membran vorkommen. Die wenigen positiven Ladungen spielen demnach eine wesentliche Rolle im Ladungsgefüge der Membrankopfregion. Neben der Neutralisation abstoßender Kräfte durch Gegenladungen könnte als zweiter wichtiger Mechanismus die Abschirmung der Ladungen durch große hydrophile Köpfe, wie sie Hopanoide und andere Lipide tragen, treten.

NES, HEFTMAN (1981) diskutieren darüber hinaus Triterpenoide auch in ihrer Rolle als Brückenmoleküle zwischen Proteinen und Lipiden. Die vorliegende Arbeit erlaubt keine Aussagen zu diesem Problem.

4.4. Wachstumsexperimente mit Bacillus acidocaldarius[1]

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Verständnis über die Adaptation der Membranlipide von Bacillus acidocaldarius an thermo-acidophile Verhältnisse angestrebt.
Die Vorstellungen über die Adaptationsleistungen der verschiedenen Lipidsorten wurden an Membranmodellen gewonnen. Die Modelle enthalten notwendig eine Reihe von Vereinfachungen gegenüber der natürlichen Membran aus Bacillus acidocaldarius. Erwähnt sei nur das völlige Ausblenden von Membranproteinen, die ebenfalls kondensierend auf Lipide wirken (PRINGLE, CHAPMAN, 1981) und die Vernachlässigung von Kopfgruppeneinflüssen.

---

1) Aus: PORALLA, K., HÄRTNER, T., KANNENBERG, E., in Vorbereitung

Die Richtigkeit der aus den Membranmodellen gezogenen Schlüsse und Charakterisierungen werden demnach erst durch Studien am Organismus selbst bewiesen.

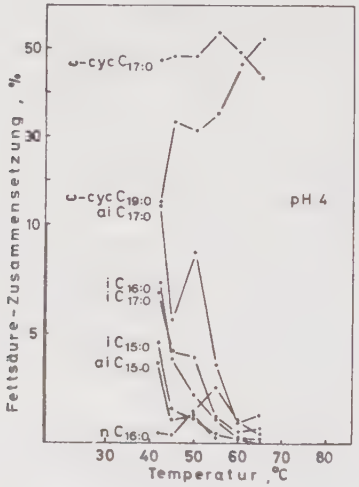


Abb. 51: Das Fettsäurespektrum von Bacillus acidocaldarius in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur (pH 4)

Abb. 51 zeigt, daß der Anteil an ω-Cyclohexanlipiden mit der Temperatur wächst, während gleichzeitig die Konzentration an verzweigten Lipiden abnimmt.
Tendenziell gleich reagierte das Fettsäurespektrum auf die Erniedrigung des pH-Wertes.
Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit der Charakterisierung von ω-Cyclohexanlipiden als Membranstabilisierer und verzweigten Lipiden als Fluidisierer.

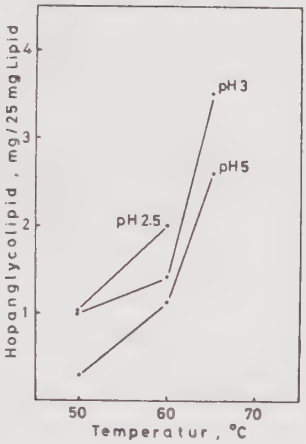


Abb. 52: Der Hopanoidgehalt in Abhängigkeit von der Temperatur und dem pH-Wert

Die gefundenen Hopanoidgehalte zeigen eine geringe Abhängigkeit vom pH-Wert, korrelieren aber stark mit steigenden Temperaturen.
Es zeigt sich, daß auch in diesem Experiment die als Membranstabilisatoren eingestuften Hopanoide im Organismus in der zu erwartenden Richtung reguliert werden.

Diese Wachstumsexperimente beweisen, daß die Membranmodelle trotz der getroffenen Vereinfachungen, für die Membran von Bacillus acidocaldarius wichtige Sachverhalte richtig wiederspiegeln.
Da die Wachstumsexperimente nicht Thema der vorliegenden Arbeit waren, werden sie nicht ausführlich diskutiert. Es sei nur angemerkt, daß die Ergebnisse einer älteren Arbeit von DE ROSA et al. (1974) widersprechen, der die aufgezeigten Abhängigkeiten im Fettsäuremuster nicht finden konnte.

4.5. Ausblick

Sei abschließend noch kurz erörtert, ob Hopanoide und ω-Cyclohexanlipide die einzige Antwort der Bakterienevolution auf hohe Temperaturen und pH-Streß darstellen.

PORALLA, KÖNIG (1983) fanden in jüngster Zeit in Bacillen aus Bodenproben ω-Cycloheptanfettsäuren. Diese Untersuchung bestätigt damit das Prinzip der Membranstabilisierung über voluminöse Kettenenden. Ob noch größere Kohlenwasserstoffringe an den Acylketten gefunden werden können, muß bezweifelt werden, da Gerüstverspannungen und thermodynamische Instabilitäten mit der Ringgröße wachsen.
Lipide mit geraden und verzweigten Fettsäuren, mit ω-Cyclohexan- und ω-Cycloheptanfettsäuren, die allesamt in verschiedenen Kettenlängen auftreten können, bauen mit den als Membranstabilisatoren fungierenden Hopanoiden und Carotinoiden (z.B. BISSERET et al., 1983) herkömmliche Bilayer-Membranen auf, die bis etwa 85°C stabil sind (WISDOM, WELKER, 1973; SUOZA et al., 1974; OSHIMA, MIYAGAWA, 1974; HEINEN, HEINEN, 1972; WEERKAMP, HEINEN, 1972; HASEGAWA et al., 1980).

Einen völlig davon modifizierten Mechanismus der Thermoadaptation haben Archaebakterien evolviert (z.B. Sulfolobus, Thermoplasma). Deren Membranen bauen sich z.T. aus die gesamte Membran durchspannenden Kohlenwasserstoffketten auf, deren beide Enden über Ätherbindungen an hydrophile Glycerine verknüpft sind und damit Tetraätherstrukturen bilden. Diese Struktur entspricht also eher einem bipolaren Monolayer, in dessen hydrophoben Bereich noch zusätzliche Ringstrukturen stabilisierend wirken können (Übersichtsartikel: LANGWORTHY, 1982).
Mit dieser Membranstruktur scheinen zumindest Archaebakterien an bislang nicht für möglich gehaltene Temperaturen zu adaptieren So konnte STETTER (1982) aus einem marinen, vulkanischen Biotop ein Archaebakterium isolieren (STETTER, persönliche Mitteilung), das noch bei 105°C wächst. Von BAROSS, DEMING (1983) wurde gar eine ernährungsphysiologisch schlecht definierte Mischkultur von Bakterien beschrieben, die bis 250°C wachsen soll.
Obwohl letzterer Befund noch in keinem anderen Labor reproduziert wurde, lassen doch die Ergebnisse vermuten, daß letztlich nicht Zellstrukturen der limitierende Faktor für Wachstum sein müssen, sondern daß die Existenz einer flüssigen Wasserphase konstitutiv ist

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Glycerolipide der Cytoplasmamembran des thermo-acidophilen Bacillus acidocaldarius enthalten neben Fettsäuren mit einer iso- oder anteiso-Verzweigung hauptsächlich Fettsäuren mit einem ω-Cyclohexanring. Mit verschiedenen Hopanabkömmlingen (u.a. THBH, HGL) enthält die Membran eine weitere Lipidklasse, die zu den pentacyclischen Triterpenoiden gehört.

Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Frage der besonderen Leistungen von Hopanoiden und Lipiden mit ω-Cyclohexanfettsäuren für die Lebensweise in heißem und gleichzeitig saurem Milieu.
Zum Verständnis der Funktion dieser Lipide wurde die Fragestellung in erster Linie mit physikalisch-chemischen Methoden gelöst.
Dazu wurden THBH und HGL aus Bacillus acidocaldarius isoliert und Diplopterol, ein weiteres Bakteriohopanoid, aus Methylobacterium organophilum.

Exemplarisch für Glycerolipide wurden synthetische Phosphatidylcholine (PCs) untersucht. Die Moleküle enthielten zwei gleichartige Acylketten aus Fettsäuren mit einer iso- bzw. anteiso-Verzweigung oder mit einem ω-Cyclohexanring (DIHPC, DAHPC, DCDPC). Aus der gleichen Kettenlänge wie sie Palmitinsäure besitzt ergibt sich eine Vergleichbarkeit der studierten Eigenschaften dieser Lipide zu DPPC.
Untersucht wurden die PCs und PC/Hopanoid-Mischungen mit der Monolayer-Technik und der Differentiellen Mikrokalorimetrie. Außerdem wurde die Permeabilität für Glycerin u.ä. von DCDPC-Liposomen studiert und die Abhängigkeit der Permeabilität von HGL und Diplopterol in Ei-PC und DCDPC. Die Hopanoid-Wirkungen wurden mit Cholesterin verglichen.

PC-Untersuchungen

DIHPC zeigt im Kalorimeter gegen das Vergleichslipid DPPC eine um 14°C abgesenkte Phasenübergangstemperatur, aber eine nur wenig geringere Übergangsenthalpie als DPPC. Der molekulare Flächenbedarf entsprach in der flüssig-expandierten Phase des Monolayer-Films dem von DPPC, während es in der flüssig-kondensierten Phase einen 4 $Å^2$ größeren Flächenbedarf als DPPC hat.

DAHPC zeigt im Kalorimeter verglichen mit DPPC eine um 34°C stark herabgesetzte Phasenübergangstemperatur, mit ebenfalls stark herabgesetzter Übergangsenthalpie. Der molekulare Flächenbedarf liegt in der flüssig-expandierten Phase um 1 $Å^2$ (40°C) über dem von DPPC. Wegen der Monolayer-Phasenübergangstemperatur < 0°C (π = 25 dyn/cm) kann der Flächenbedarf der kondensierten Phase nur extrapoliert werden, er liegt aber über dem von DIHPC.
Die Befunde an DIHPC und DAHPC zeigen, daß sich die iso- und anteiso-Verzweigung gegen das geradkettige Vergleichslipid DPPC in einer lockereren Molekülpackung der kondensierten Phase auswirken mit dadurch bedingter schlechterer molekularer Interaktion.
Solche Lipide erfüllen eine Funktion als Membranfluidisierer. Diese Funktion wird im Hinblick auf die Thermoadaptation bei Bacillus acidocaldarius diskutiert.

DCDPC hat eine kalorimetrisch bestimmte Phasenübergangstemperatur bei 13,8°C. Der Phasenübergang setzt sich aus zwei Prozessen geringerer Übergangsenthalpie zusammen. Im Monolayer weist DCDPC keinen Phasenübergang aus. Auch bei hohen Filmdrücken nahm der Flächenbedarf linear mit der Temperatur zu und weist im Meßintervall einen weitgehend kondensierten Film aus. Der molekulare Flächenbedarf bei 40°C entsprach dem von DPPC.
Die Untersuchungen der Permeabilität von Glycerin zeigten, daß DCDPC verglichen mit geradkettigen homologen PCs eine wesentlich reduzierte Permeabilität im Phasenübergangsbereich und oberhalb des Phasenübergangs besitzt.
Dieses bisher bei keinem anderen Lipid beschriebene Verhalten legt den Schluß nahe, daß Lipide mit ω-Cyclohexanfettsäuren, offenbar aufgrund einer erhöhten Acylkettendichte, in der Membranmitte einen höheren Ordnungsgrad als vergleichbare Lipide besitzen, der sich sowohl membranstabilisierend, wie auch permeabilitätsreduzierend auswirkt.
Die Rolle solcher Lipide in der Membran von Bacillus acidocaldarius wird diskutiert.

Hopanoid-Untersuchungen

Kalorimetrisch wurde gezeigt, daß THBH den Phasenübergangsbereich von DPPC-Liposomen verbreitert und die Übergangsenthalpie absenkt. Die Wirkung

ist für kleine Konzentrationen stärker als die von Cholesterin und für Konzentrationen > 10 mol% schwächer.
Im Monolayer-Film wirkt THBH bei 40°C kondensierend auf DPPC, DIHPC, DAHPC und DCDPC. Cholesterin zeigt in diesen Lipiden eine abnehmende Kondensation in der Reihenfolge DPPC > DIHPC = DCDPC > DAHPC. Die Kondensation durch THBH wächst umgekehrt in der Reihenfolge DPPC < DCDPC = DIHPC < DAHPC.
HGL, das neben dem Hopangerüst noch ein glycosidisch gebundenes Glucosamin trägt, an das eine Acylkette gebunden ist, zeigt bei 40°C im Monolayerfilm das gleiche kondensierende Verhalten wie THBH.
Diese Wirkungen beweisen, daß Hopanoide in definierten PCs cholesterinanalog wirken. Allerdings legen die Befunde den Schluß nahe, daß die Wirkungsmechanismen von Cholesterin und von Hopanoiden verschieden sind. So wird für Hopanoide ein mehr das Acylkettenende beeinflussender Mechanismus diskutiert.
Die Wirkungen der Hopanoide, die ihre Ursachen in einer dichteren Packung der Lipidmoleküle und in einer Restriktion der Acylkettenbeweglichkeit haben, werden als wesentlicher Mechanismus der Membranstabilisierung bei der Adaptierung an Temperaturstreß diskutiert.
Im Liposomen-Experiment senken Hopanoide die Permeabilität von Glycerin. Diese permeabilitätsreduzierende Eigenschaft ist für Konzentrationen bis 10 mol% etwa gleich denen von Cholesterin und wird erst für höhere Konzentrationen schlechter.
Die Eigenschaft von Hopanoiden, die Permeabilität zu reduzieren, wird auch als wesentlich für die Adaptierung von Bacillus acidocaldarius an heißes und saures Milieu diskutiert.

Wegen der cholesterinanalogen Wirkung von Hopanoiden wurde im biologischen Experiment mit Mycoplasma versucht, dessen Cholesterin-Bedürfnis durch Gaben an Hopanoiden zu erfüllen.
HGL kann Cholesterin nicht ersetzen. Diplopterol dagegen zeigt einen stimulierenden Effekt auf die Wachstumsrate und den Wachstumsertrag von M. mycoides. Die Wirkung bleibt jedoch erheblich hinter der von Cholesterin.
Die Ergebnisse schließen aus, daß Diplopterol und Hopanoide in der Mycoplasmen-Membran cholesterinanalog wirken. Ihre wachstumsstimulierende Wirkung könnte eher der Ausdruck ihrer Fähigkeit zur Kopfgruppen- und Ladungstrennung sein.

Die gefundenen Eigenschaften von Hopanoiden und Lipiden mit ω-Cyclohexanfettsäuren machen den Nutzen dieser Verbindungen für ein Leben unter heißen und gleichzeitig sauren Bedingungen verständlich.
Wie in der Arbeit gezeigt werden konnte, sind damit die erstaunlichen physiologischen Leistungen von Bacillus acidocaldarius, soweit sie die Membranlipide betreffen, in erstaunlich einfachen konstruktiven Antworten auf der molekularen Ebene begründet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

O. ALBRECHT, H. GRULER, E. SACKMANN: Polymorphism of phospholipid monolayers. J. Physique 39, 301 (1978)

O. ALBRECHT, H. GRULER, E. SACKMANN: Pressure-composition phase diagrams of cholesterol/lecithin, cholesterol/phosphatidic acid, and lecithin/phosphatidic acid mixed monolayers: A Langmuir film balance study. J. Coll. Interf. Sci. 79, 319 (1981)

R.E. AMELUNXEN, A.L. MURDOCK: Mechanisms of thermophily. CRC Critical Reviews in Microbiology, Dec, 343 (1978)

D.B. ARCHER: Modification of the membrane composition of Mycoplasma mycoides var. capri by the growth medium. J. Gen. Microbiol. 88, 329 (1975)

A.D. BANGHAM: Physical structure and behaviour of lipids and lipid enzymes. Advan. Lipid Res. 1, 65 (1963)

A.D. BANGHAM: Membrane models with phospholipids. Prog. Biophys.Mol. Biol. 18, 29 (1968)

A.D. BANGHAM: Model membranes. Chem. Phys. Lipids 8, 386 (1972)

A.D. BANGHAM, J. DE GIER, G.D. GREVILLE: Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. Chem. Phys. Lipids 1, 225 (1967b)

A.D. BANGHAM, M.M. STANDISH, J.C. WATKINS: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 13, 238 (1965a)

A.D. BANGHAM, M.M. STANDISH, G. WEISSMANN: The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cation. J. Mol. Biol. 13, 253 (1965b)

A.D. BANGHAM, M.M. STANDISH, J.C. WATKINS, G. WEISSMANN: The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. Protoplasma 63, 183 (1967a)

J.A. BAROSS, J.W. DEMING: Growth of 'black smoker' bacteria at temperatures of at least 250°C. Nature 303, 423 (1983)

P.G. BARTON, F.D. GUNSTONE: Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithin. J. Biol. Chem. 250, 4470 (1975)

S. BĚLEHRÁDEK: Le mechanisme physico-chemique de l'adaptation thermique. Protoplasma 12, 406 (1937)

R. BENZ, D. HALLMANN, K. PORALLA, H. EIBL: Interactions of hopanoids with phosphatidylcholines containing oleic and ω-cyclohexyldodecanoic acid in lipid bilayer membranes. Chem. Phys. Lipids, im Druck (1983)

R. BITTMANN, L. BLAU: The phospholipid - cholesterol interaction. Kinetics of water permeabilität in liposomes. Biochemistry 11, 4831 (1972)

P. BISSERET, G. WOLFF, A.M. ALBRECHT, T. TANAKA, Y. NAKATANI, G. OURISSON: A direct study of the cohesion of lecithin bilayers: The effect of hopanoids and α, ω-dihydroxy-carotenoids. Biochem. Biophys. Res. Comm. 110, 320 (1983)

E.G. BLIGH and W.J. DYER: A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911 (1959)

K. BLOCH: Sterol Structure and membrane function. Curr. Top. in Cell. Regulation 18, 289 (1981)

M.C. BLOK, L.L.M. VAN DEENEN, J. DE GIER: The effect of cholesterol incorporation on the temperature dependence of water permeation through liposomal membranes prepared from phosphatidylcholines. Biochim. Biophys. Acta 464, 509 (1977)

A. BLUME: Untersuchungen zur Thermodynamik der Phasenumwandlung von Phospholipiden in wässrigen Dispersionen. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmacie, Albert-Ludwig-Universität Freiburg i.Br. (1976)

A. BLUME: A comperative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. Biochim. Biophys. Acta 557, 32 (1979)

A. BLUME: Thermotropic behaviour of phosphatidylethanolamine-cholesterol and phosphatidylethanolamine-phosphatidylcholine-cholesterol mixtures. Biochemistry 19, 4908 (1980)

A. BLUME, R. DREHER, K. PORALLA: The influence of branched-chain and ω-alicyclic fatty acids on the transition temperature of Bacillus subtilis lipids. Biochim. Biophys. Acta 512, 489 (1978)

H. BROCKERHOFF: Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. Lipids 9, 645 (1974)

J.L. BROWNING: Motions and interactions of phospholipid head groups at the membrane surface. 2. Head groups with hydroxyl groups. Biochemistry 20, 7133 (1981)

G. BÜLDT, H. GALLY, A. SEELIG, J. SEELIG, G. ZACCAI: Neutron diffraction studies on selectively deuterated phosphilipid bilayers. Nature 271, 182 (1978)

D.A. CADENHEAD, B.M.J. KELLNER, D.M. BALTHASAR: Cholesterol oxidation and the behaviour of 5-α-hydro-peroxy-cholesterol at the air water interface. Chem. Phys. Lipids 31, 87 (1982)

D.A. CADENHEAD, B.M. KELLNER, M.C. PHILLIPS: The miscibility of dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol in monolayers. J. Coll. Interf. Sci. 57, 224 (1976)

D.A. CADENHEAD, F. MÜLLER-LANDAU: Molecular packing in steroid-lecithin monolayers. Part. III: Mixed films of 3-doxyl-cholestane and 3-doxyl-17-hydroxyl-androstane with dipalmitoylphosphatidylcholine. Chem. Phys. Lipids 25, 329 (1979)

D.A. CADENHEAD, M.C. PHILLIPS: Monolayers of some naturally occuring polycyclic compounds. J. Coll. Interf. Sci. 24, 491 (1967)

D.A. CADENHEAD, M.C. PHILLIPS: Molecular interactions in mixed monolayers. Adv. Chem. Ser. 84, 131 (1968)

R.A. CAPALDI, D.E. GREEN: Membrane proteins and membrane structure. FEBS Let. 25, 205 (1972)

D. CHAPMAN: Liquid crystals and cell membranes. Ann.N.Y. Acad. Sci. 137, 745 (1966)

D. CHAPMAN: Fluidity and phase transition of cell membranes. In: Biomembranes, Vol. 7, 1 (1975). Ed.: H. Eisenberg, E. Katchalski-Katzir, L.A. Manson; Plenum Press, New York

D. CHAPMAN: Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. Q. Rev. Biophys. 8, 185 (1975)

D. CHAPMAN, N.F. OWENS, D.A. WALKER: Physical studies of phospholipids. II. Monolayer studies of some synthetic 2,3-diacyl-DL-phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines containing trans double bonds. Biochim. Biophys. Acta 120, 148 (1966)

D. CHAPMAN, N.F. OWENS, M.C. PHILLIPS, D.A. WALKER: Mixed monolayers of phospholipids and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 183, 458 (1969)

D. CHAPMAN, J. URBINA, K.M. KEOUGH: Biomembrane phase transitions. Studies of lipid-water systems using differential scanning calorimetry. J. Biol. Chem. 249, 2512 (1974)

D. CHAPMAN, R.M. WILLIAM, B.D. LADBROOKE: Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacylphosphatidylcholines (lecithins). Chem. Phys. Lipids 1, 445 (1967)

N. CHATTERJIE, H. BROCKERHOFF: Evidence for stereospecific phospholipid-cholesterol interaction in lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta 511, 116 (1978)

S. CLEJAN, R. BITTMANN,S. ROTTEM: Uptake, transbilayer distribution, and movement of cholesterol in growing Mycoplasma capricolum cells. Biochemistry 17, 4579 (1978)

S. CLEJAN, R. BITTMANN, P.W. DEROO, Y.A. ISAACSON, A.F. ROSENTHAL: Permeability properties of sterol-containing liposomes from analogues of phosphatidylcholine lacking acyl groups. Biochemistry 18, 2118 (1979)

B.E. COHEN: The permeability of liposomes to nonelectrolytes. I. Activation energies for permeation. J. Membrane Biol. 20, 205 (1975)

B.A. CORNELL, D. CHAPMAN, W.E. PEEL: Random close-packed arrays of membrane components. Chem. Phys. Lipids 23, 223 (1979)

D.G. CORNWELL, G.S. PATIL: In: Polyunsaturated Fatty Acids, 105 (1977). Ed.: W.H. Kunau and R.T. Holman. Amer. Oil Chem. Soc.

A.R. COSSINS: The adaption of membrane dynamic structure to temperature. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes, 83 (1981). Ed.: G.J. Morris, A. Clarke. Academic Press London, New York

I.F. CRAIG, G.S. BOYD, K.E. SUCKLING: Optimum interaction of sterol side chains with phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta 508, 418 (1978)

J.E. CRONAN, E.P. GELMANN: Physical properties of membrane lipids: Biological relevance and regulation. Bacteriol. Rev. 39, 232 (1975)

C.E. DAHL, J.S. DAHL, K. BLOCH: Effect of alcyl-substituted precursors of cholesterol on artificial and natural membranes and on the viability of Mycoplasma capricolum. Biochemistry 19, 1462 (1980a)

C.E. DAHL, J.S. DAHL, K. BLOCH: Effects of cycloartenol and lanosterol on artificial and natural membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 92, 221 (1980b)

J.S. DAHL, C.E. DAHL, K. BLOCH: Effect of cholesterol on macromolecular synthesis and fatty acid uptake by Mycoplasma capricolum. The J. Biol. Chemistry 256, 87 (1981)

A. DARKE, E.G. FINER, A.G. FLOOK, M.C. PHILLIPS: Nuclear magnetic resonance study of lecithin-cholesterol interactions. J. Mol. Biol 63, 265 (1972)

G. DARLAND, T.D. BROCK: Bacillus acidocaldarius sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. J. Gen. Microbiol. 67, 9 (1971)

J.B. DAVENPORT: Physical chemistry of lipids. In: Biochemistry and Methodology of Lipids, 47 (1971). Ed.: A.R. Johnson, J.B. Davenport. Wiley-Interscience, New York

L. DE BERNARD: Molecular association between lipids. II. Lecithin and cholesterol. Bull. Soc. Chim. Biol. 40, 161 (1958)

J. DE GIER, J.G. MANDERSLOOT, L.L.M. VAN DEENEN: Lipid composition and permeability of liposomes. Biochim. Biophys. Acta 150, 666 (1968)

J. DE GIER, J.G. MANDERSLOOT, L.L.M. VAN DEENEN: The role of cholsterol in lipid membranes. Biochim. Biophys. Acta 173 (1969)

J. DE GIER, J.G. MANDERSLOOT, J.V. HUPKES, R.N. MCELHANEY, W.P. VAN BEEK: On the mechanism of non-electrolyte permeation through lipid bilayers and through biomembranes. Biochim. Biophys. Acta 233, 610 (1971)

B. DE KRUYFF, R.A. DEMEL, A.J. SLOTBOOM, L.L.M. VAN DEENEN, A.F. ROSENTHAL: The effect of the polar headgroup on the lipid-cholesterol interaction: A monolayer and differential scanning calorimetry study. Biochim. Biophys. Acta 307, 1 (1973b)

B. DE KRUYFF, R.A. DEMEL, L.L.M. VAN DEENEN: The effect of cholesterol and epicholesterol incorporation on the permeability and on the phase transition of intact Acholeplasma laidlawii cell membranes and derived liposomes. Biochim. Biophys. Acta 255, 331 (1972)

B. DE KRUYFF, W.J. DE GREEF, R.V.W. VAN EYK, R.A. DEMEL, L.L.M. VAN DEENEN: The effect of different fatty acid and sterol composition on the erythritol flux through the cell membrane of Acholeplasma laidlawii. Biochim. Biophys. Acta 298, 479 (1973a)

R.A. DEMEL: Interaction between lecithins and cholesterol at the air-water and oil-water interfaces. J. Am. Oil. Chem. Soc. 45, 304 (1968)

R.A. DEMEL: Monolayers - description of use and interaction. In: Methods in Enzymol. Vol. 32, 539 (1974). Ed.: S. Fleischer. Academic Press, New York

R.A. DEMEL, K.R. BRUCKDORFER, L.L.M. VAN DEENEN: Structural requirements of sterol for the interaction with lecithin at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta 255, 311 (1972a)

R.A. DEMEL, K.R. BRUCKDORFER, L.L.M. VAN DEENEN: The effect of sterol structure on the permeability of liposomes to glucose, glycerol and Rb^+. Biochim. Biophys. Acta 255, 321 (1972b)

R.A. DEMEL, W.S.M. GEURTS VAN KESSEL, L.L.M. VAN DEENEN: The properties of polyunsaturated lecithin in monolayers and liposomes and the interaction of these lecithins with cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 266, 26 (1972c

R.A. DEMEL, W.S.M. GEURTS VAN KESSEL, R.F.A. ZWAAL, B. ROELOFSON, L.L.M. VAN DEENEN: Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. Biochim. Biophys. Acta 406, 97 (1975)

R.A. DEMEL, B. DE KRUYFF: The function of sterol in membranes. Biochim. Biophys Acta 457, 109 (1976)

R.A. DEMEL, B. DE KRUYFF: The function of sterol in membranes. Biochim. Biophys Acta 457, 109 (1976)

R.A. DEMEL, L.L.M. VAN DEENEN, B.A. PETHICA: Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 135, 11 (1967)

D. DE MENDOZA, J.E. CRONAN: Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. Trends Biochem. Sci. Febr. 83, 49 (1983)

M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, J.D. BU'LOCK: An isolate of Bacillus acidocaldarius, an acidophilic thermophile with unusual lipids. Giorn. Microbiol. 145, 19 (1971a)

M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, L. MINALE, J.D. BU'LOCK: Cydohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. J. Chem. Soc. London, Chem. Commun., 1334 (1971b)

M. DE ROSA, A. GAMBACORTA, J.D. BU'LOCK: Effects of pH and temperatur on the fatty acid composition of Bacillus acidocaldarius. J. Bacteriol. 117, 212 (1974)

D.G. DERVICHIAN: The existence and significance of molecular associates in mono nolayers. In: Surface Science in Chemistry and Biology, 70 (1958). Ed.: J.F. Danielli, K.G.A. Pankhurst, A.C. Riddeford. Pergamon Press, Oxford

J.M. DIAMOND, Y. KATZ: Interpretation of nonelectrolyte partition coefficients between dimyristoyl lecithin and water. J. Membran Biol. 17, 121 (1974)

R. DREHER: Untersuchungen zur Funktion von ω-alicyclischen Fettsäuren in Bacillus-Membranen. Diss. an der Univ. Tübingen (1978)

M. EDIDIN, D. FAMBROUGH: Fluidity of the surface of cultured muscle fibers. Rapid lateral diffusion of marked surface antigens. J. Cell. Biol. 57, 27 (1973)

D.G. EDWARD, W.A. FITZGERALD: Cholesterol in the growth of organism of the Pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol. 5, 576 (1951)

H. EIBL, S. KOVATCHEV: Preparation of phospholipids and their analogs by Phospholipase D. In: Methods in Enzymol. Vol. 72, 632 (1981). Ed.: J.M. Lowenstein. Academic,Press New York

J. ENGEL, G. SCHWARZ: Kooperative Konformationsumwandlungen von linearen Biopolymeren. Angew. Chem. 82, 468 (1970)

D.M. ENGELMANN, J.E. ROTHMANN: The planar organization of lecithin-cholesterol bilayers. J. Biol. Chem. 247, 3694 (1972)

T. ENDO, K. INOUE, S. NOJIMA, S. TERASHIMA, T. OSHIMA: Synthesis and physical properties of phosphatidylcholines containing ω-cyclohexyl fatty acyl chaines. Chem. Phys. Lipids 31, 61 (1982)

M. ESFAHANI, A.R. LIMBRICK, S. KNUTTON, T. OKA, S.J. WAKIL: The molecular organization of lipids in the membrane of Escherichia coli: Phase transitions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 3180 (1971)

A.F. ESSER, K.A. SOUZA: Correlation between thermal death and membrane fluidicy in Bacillus stearothermophilius. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4111 (1974)

A.F. ESSER, K.A. SOUZA: Growth temperature and the structure of the lipid phase in biological membranes. In: Extreme Environments: Mechanisms of Microbial Adaption, 283 (1976). Ed.: M.R. Heinrich. Academic Press, New York

T.N. ESTEP, D.B. MOUNTCASTLE, L. BILTONEN, T.E. THOMPSON: Studies on the anomalous thermotropic behaviour of aquous dispersions of dipolmitoylphospatidylcholine-cholesterol mixtures. Biochemistry 17, 1984 (1978)

R.W. EVANS, J. TINOCO: Monolayers of sterols and phosphatidylcholines containing a 20-carbon chain. Chem. Phys. Lipids 22, 207 (1978)

A. FINKELSTEIN, A. CASS: Permeability and electrical properties of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. 52, 145 (1968)

H.J. FÖRSTER, K. BIEMANN, W.G. HAIGH, N.H. TATTRIE, J.R. COLVIN: The structure of novel C_{35}-pentacyclic terpenes from Acetobacter xylinum. Biochem. J. 135, 133 (1973)

N.P. FRANKS: Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers. J. Mol. Biol. 100, 345 (1976)

G.L. GAINES: In: Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces (1966). Wiley (Interscience), New York

H.-J. GALLA, E. SACKMANN: Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. Biochim. Biophys. Acta 339, 103 (1974)

W.R. GALEY, J.D. OWEN, A.K. SOLOMON: Temperature dependence of nonelectrolyte permeation across red cell membranes. J. Gen. Physiol. 61, 727 (1973)

S. GALLUCI, S. MICELLI, C. LIPPE: Effect of cholesterol on the non-electrolyte permeability of planar lecithin membranes. Nature 255, 722 (1975)

H. GALLY, W. NIEDERBERGER, J. SEELIG: Conformation and motion of the choline headgroup in bilayers of dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine. Biochemistry 14, 3647 (1975)

N.L. GERSHFELD: Thermodynamics and experimental methods for equilibrium studies with lipid monolayers. In: Methods in Membrane Biology, Vol. 1, 69, (1974). Ed.: E.D. Korn. Plenum Press, New York

N.L. GERSHFELD: Physical chemistry of lipid films at fluid interfaces. Ann. Rev. Phys. Chem. 27, 349 (1976)

N.L. GERSHFELD: Equilibrium studies of lecithin-cholesterol interactions. I. Stoichiometry of lecithin-cholesterol compexes in bulk systems. Biophys. J. 22, 469 (1978)

N.L. GERSHFELD: The liquid condensed/liquid expanded transition in lipid films: A critical analysis of the film balance experiment. J. Coll. Interf. Sci. 85, 28 (1981)

N.L. GERSHFELD, M. WORMSER, S. RAZIN: Cholesterol in Mycoplasma membranes. I. Kinetics and equilibrium studies of cholesterol uptake by the cell membrane of Acholeplasma laidlawii. Biochim. Biophys. Acta 352, 371 (1974)

N.L. GERSHFELD, K. TAJIMA: Energetics of the transition between lecithin monolayers and bilayers. J. Coll. Interf. Sci. 59, 597 (1977)

D. GHOSH, J. TINOCO: Monolayer interactions of individual lecithins with natural sterols. Biochim. Biophys. Acta 266, 41 (1972)

D. GHOSH, M.A. WILLIAMS, J. TINOCO: The influence of lecithin structure on their monolayer behaviour and interactions with cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 291, 351 (1973)

J.W. GIPPS: In: Collected works. Vol. 1, 219 (1948). Yale University Press, New Haven

S. GLASSTONE, K.J. LAIDLER, H. EYRING: In: The Theory of Rate Processes (1941). McGraw-Hill, New York, London

A. GLIOZZI, R. ROLANDI, M. DE ROSA, A. GAMBACORTA: Artificial black membranes from bipolar lipids of thermophilic Archaebacteria. Biophys. J. 37, 563 (1982)

P.E. GODICI, F.R. LANDSBERGER: ^{13}Nuclear magnetic resonance study of the dynamic structure of lecithin-cholesterol membranes and the position of stearic acid spin-labels. Biochemistry 14, 3927 (1975)

T. GULICK-KRZYWICKI: Structural studies of the associations between biological membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 415, 1 (1975)

R.A. HABERKORN, R.G. GRIFFIN, M.D. MEADOWS, E. OLDFIELD: Deuterium nuclear magnetic resonance investigation of dipalmitoyl-lecithin-cholesterol-water systems. J. Am. Chem. Soc. 99, 735 (1977)

C.W.M. HAEST, A.J. VERKLEIJ, J. DE GIER, R. SCHEEK, P.M.J. VERVERGAERT, L.L.M. VAN DEENEN: The effect of lipid phase transitions on the architecture of bacterial membranes. Biochim. Biophys. Acta 356, 17 (1974)

H. HALPAAP: Präp. Dünnschichtchromatographie. Chemie-Ing. Techn.35, 488 (1963)

H. HALPAAP: Grundzüge der präp. Schichtchromatographie. Chem.Ztg.89, 835 (1965)

T. HANAI, D.A. HAYDON: The permeability to water of biomolecular lipid membranes. J. Theoret. Biol. 21, 370 (1966)

Y. HASEGAWA, N. KAWADA, Y. NOSOH: Change in chemical composition of membrane of Bacillus caldotenax after shifting the growth temperature. Arch. Microbiol. 126, 103 (1980)

H. HAUSER, I. PASCHER, R.H. PEARSON, S. SUNDELL: Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. Biochim. Biophys. Acta 650, 21 (1981)

M. HAYASHI, T. MURAMATSU, I. HARA: Surface properties of synthetic phospholipids. Biochim. Biophys. Acta 255, 98 (1973a)

M. HAYASHI, T. MURAMATSU, I. HARA: Surface properties of synthetic phospholipids. II. Thermal phase transition in monolayers. Biochim. Biophys. Acta 291, 335 (1973b)

L.V. HEILBRUNN: The colloid chemistry of prooplasm. IV. The heat coagulation of protoplasm. Am. J. Physiol. 69, 190 (1924)

U.J. HEINEN, W. HEINEN: Characteristics and properties of a caldo-active bacterium producing extracellular enzymes and two related strains. Arch. Microbiol. 82, 1 (1972)

M.A. HEMMINGA, H.J.C. BERENDSEN: Magnetic resonance in ordered lecithin-cholesterol multilayers. J. Magn. Reson. 8, 133 (1972)

R.A. HERBERT: Low temperature adaption in bacteria. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes, 41 (1981). Ed.: G.J. Morris, A. Clarke. Academic Press, London, New York

H.J. HINZ, J.M. STURTEVANT: Calorimetric investigation of the influence of cholesterol on the transition properties of bilayer formed from synthetic L-α-lecithin in aquous suspensions. J. Biol. Chem. 247, 3697 (1972)

B. HIPPCHEN, A. RÖLL, K. PORALLA: Occurrence of soil of thermo-acidophilic Bacilli possessing ω-cyclohexane fatty acids and hopanoids. Arch. Microbiol. 129, 53 (1981)

U. HOPFER, A.L. LEHNINGER, W.J. LENNARZ: The effect of the polar moiety of lipids on the ion permeability of bilayer membranes. J. Membrane Biol. 2, 41 (1970)

C. HUANG: A. structural model for the cholesterol-phosphatidylcholine complex in bilayer membranes. Lipids 12, 348 (1977)

L. HUANG, S.K. LORCH, G.G. SMITH, A. HAUG: Control of membrane lipid fluidity in Acholeplasma laidlawii. FEBS Let. 43, 1 (1974)

S.W. HUI, M. COWDEN, D. PAPAHADJOPOULOS, D.F. PARSONS: Electron diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers: effects of temperature, hydration and surface pressure of the "precursor" monolayer. Biochim. Biophys. Acta 382, 265 (1975)

Y. INOKO, T. MITSUI: Structural parameters of dipalmitoyl phosphatidylcholine lamellar phases and bilayer phase-transitions. J. Phys. Soc. Japan 44, 1918 (1978)

K. INOUE: Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. Biochim. Biophys. 339, 390 (1974)

J.N. ISRAELACHVILI: Physical priciples and modes of interactions of membrane lipids and amphiphiles. In: Chemistry and Biological Activities of Bacterial Surface Amphiphiles, 119 (1981). Ed.: G.D. Shockman, A. Wicken. Academic Press New York,London

M.H. JACOBS, H.N. GLASSMANN, A.K. PARPART: Hemolyses and zoological relationship. Comparative studies with four penetrating non-electrolytes. J. Exptl. Zool. 113, 277 (1950)

R. JACOBS, E. OLDFIELD: Deuterium nuclear magnetic resonance investigation of dimyristoylphospahtidylcholine-dipalmitoylphosphatidylcholine and dimyristoylphospahtidylcholine-cholesterol mixtures. Biochemistry 18, 3280 (1979)

K. JACOBSON, D. PAPAHADJOPOULOS: Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH and concentration of bivalent cations. Biochemistry 14, 152 (1975)

F. JÄHNIG, K. HARLOS, H. VOGEL, H. EIBL: Electrostatic interactions at charged lipid membranes. Electrostatically induced tilt. Biochemistry 18, 1459 (1979)

M.K. JAIN: Role of cholesterol in biomembranes and related systems. Curr. Topics Membranes Transp. 6, 1 (1975)

M.K. JAIN: 4) The bilayer and related structures
5) Phase properties of bilayers
6) Partitioning of solutes in bilayers: Passive permeability.
In: Introduction to Biological Membranes, 53 (1980). Ed. M.K. Jain, R.C. Wagner, J. Wiley and Sons, New York

M.K. JAIN, H.B. WHITE: Long-range order in biomembranes. Advan. Lipid Res. 15, 1 (1977)

M.J. JANIAK, D.M. SMALL, G.G. SHIPLEY:Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: Dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. Biochemistry, 15, 4575 (1976)

M.J. JANIAK, D.M. SMALL, G.G. SHIPLEY:Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. J. Biol. Chem. 254, 6068 (1979)

P. JOOS, R.A. DEMEL: The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta 183, 447 (1969)

I. KAHANE, S. RAZIN: Cholesterol-phosphatidylcholin dispersions as donors of cholesterol to Mycoplasma membranes. Biochim. Biophys. 471, 32 (1977)

T. KANEDA: Fatty acids of the genus Bacillus: an example of branched-chain preference. Bacteriol. Rev. 41, 391 (1977)

E. KANNENBERG: Über die kondensierende Wirkung von C_{35}-Tetrol (Bacteriohopan-Tetrol) aus Bacillus acidocaldarius. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen(1979)

E. KANNENBERG, K. PORALLA, A. BLUME: A hopanoid from the thermo-acidophilic Bacillus acidocaldarius condenses membranes. Naturwissenschaften 67, 458 (1980)

E. KANNENBERG, A. BLUME, R.N. MCELHANEY, K. PORALLA: Monolayer and calorimetric studies of phospatidylcholines containing branched-chain fatty acids and of their interactions with colesterol and with a bacterial hopanoid in model membranes. Biochim. Biophys. Acta (1983) in Druck

M. KATES: Techniques of lipidology; Isolation, analysis and identification of lipids. (1972). Ed.: T.S. Work, E. Work. North-Holland Publishing Company Amsterdam London, American Elsevier Publishing Co. Inc.,New York

W. KRISCHKE: Die Isolierung und Charakterisierung pH- und Temperatur-sensitive Mutanten von Bacillus acidocaldarius. Diplomarbeit Fachbereich Biologie. Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1982)

P.A. KROON, J.P. KAINOSHO, S.I. CHAN: State of molecular motion of cholesterol in lecithin bilayers. Nature 256, 582 (1975)

T.A. KRULWICH, L.F. DAVIDSON, J.F. STANLEY, R.S. ZUCKERMAN, A.A. GUFFANTI: The protonmotive force and β-galactoside transport in Bacillus acidocaldarius. The J. Biol. Chemistry 253, 4599 (1978)

B.D. LADBROOKE, D. CHAPMAN: Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. Chem. Phys. Lipids 3, 304 (1969)

B.D. LADBROOKE, R.M. WILLIAMS, D. CHAPMAN: Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. Biochim. Biophys. Acta 150, 333 (1968)

A.K. LALA, H.K. LIN, K. BLOCH: The effect of some alkyl derivatives of cholesterol on the permeability properties and microviscosities of model membranes. Bioorganic Chemistry 7, 437 (1978)

A.M.W. LANCÉE-HERMKENS, B. DE KRUYFF: ^{13}C NMR measurements of unsonicated phospahtidylcholine bilayers of different fatty acid and sterol composition. Biochim. Biophys. Acta 470, 141 (1977)

I. LANGMUIR: The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. J. Am. Chem. Soc. 39, 1848 (1917)

T.A. LANGWORTHY: Lipids of bacteria living in extreme environments. In: Curr. Topics Membranes Transp.,17,45(1982).Ed.: F. Bronner, A. Kleinzeller. Academic Press, New York, London

T.A. LANGWORTHY, W.R. MAYBERRY, P.F. SMITH: A sulfonolipid and novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 550 (1976)

T.A. LANGWORTHY, W.R. MAYBERRY: 1,2,3,4-tetrahydroxypentane-substituted pentacyclic triterpene from Bacillus acidocaldarius. Biochim. Biophys. Acta 431, 570 (1976)

J.B. LEATHES: Role of fats in vital phenomena. Lancet 208, 853 (1925)

S. LEGENDRE, L. LETELLIER, E. SHECHTER: Influence of lipids with branched-chain fatty acids on the physical, morphological and functional properties of Escherichia coli cytoplasmic membrane. Biochim. Biophys. 602, 491 (1980)

Y.K. LEVINE: Physical studies of membrane structure. Prog. Biophys. Mol. Biol. 24, 1 (1972)

W.R. LIEB, W.D. STEIN: Biological membranes behave as non-porous polymeric sheets with respect to the diffusion of non-electrolytes. Nature 224, 240 (1969)

C.D. LINDEN, K.L. WRIGHT, H.M. MCCONNELL, C.F. FOX: Lateral phase separation in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2271 (1973)

Y. LONDON, R.A. DEMEL, W.S.M. GEURTS VAN KESSEL, P. ZAHLER, L.L.M. VAN DEENEN: The interaction of the "folch-lees" protein with lipids at the air-water interface. Biochim. Biophys. 332, 69 (1974)

R.A. LONG, F. HRUSKA, H.D. GESSER, J.C. HSIA, R. WILLIAMS: Membrane condensing effect of hcolesterol and the role of its hydroxylgroup. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 321 (1970)

B. LUNDBERG: A surface film study of the lateral packing of phosphatidylcholine and cholesterol. Chem. Phys. Lipids 31, 23 (1982)

V. LUZATTI: X-ray diffraction studies of lipid-water systems in biological membranes. In: Biological Membranes, 71 (1968).Ed.: D. Chapman, Academic Press, Inc., New York

S. MABREY, J.M. STURTEVANT: Investigation of phase transition of lipids and lipid mixtures by high sensivity differential scanning calorimetry. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 3862 (1976)

S. MABREY, J.M. STURTEVANT: High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems. In: Methods in Membrane Biology, Vol. 9, 237 (1978). Ed.: E.D. Korn. Plenum Press New York

S. MABREY, P.L. MATEO, J.M. STURTEVANT: High-sensivity scanning calorimetric study fo mixtures of cholesterol with dimyristoyl-and dipalmit 1phosphatidylcholines. Biochemistry 17, 2464 (1978)

D. MARSH, A. WATTS, P.F. KNOWLES: Evidence für phase boundary lipid. Permeability of tempo-choline into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles at the phase transition. Biochemistry 15, 3570 (1976)

R.B. MARTIN, P.L. YEAGLE: Models for lipid organization in cholesterol-phospholipid bilayers including cholesterol dimer formation. Lipids 13, 594 (1978)

R.N. MCELHANEY: The effect of alterations in the physical state of the membrane lipids on the ability of Acholeplasma laidlawii B to grow at various temperatures. J. Mol. Biol. 84, 145 (1974)

R.N. MCELHANEY: The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. Chem. Phys. Lipids 30, 229 (1982)

R.N. MCELHANEY, J. DE GIER, L.L.M. VAN DEENEN: The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the permeability of Mycoplasma laidlawii B cells and derived liposomes. Biochim. Biophys. Acta 219, 245 (1970)

R.N. MCELHANEY, J. DE GIER, E.L.M. VAN DER NEUT-KOK: The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the non-electrolyte permeability of Acholeplasma laidlawii B cells and derived liposomes. Biochim. Biophys. Acta 298, 500 (1973)

R.N. MCELHANEY, K.A. SOUZA: The relationship between environmental temperature, cell growth and the fluidity of the physical state of the membrane lipids in Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta 443, 348 (1976)

D. MELCHIOR: Lipid phase transitions and regulation of membrane fluidity in prokaryotes. In: Curr. Topics Membranes Transp. 17, 263 (1982). Ed.: F. Bronner, A. Kleinzeller. Academic Press New York, London

D.L. MELCHIOR, H.J. MOROWITZ, J.M. STURTEVANT, TIAN YOW TSONG: Characterization of the plasma membrane of Mycoplasma laidlawii. VII. Phase transition of membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta 219, 114 (1970)

D.M. MICHAELSON, A.F. HORWITZ, M.P. KLEIN: Head group modulation of membrane fluidity in sonicated phospholipid dispersions. Biochemistry 13, 2605 (1974)

D.E. MINNIKIN, H. ABDOLRAHIMZADEM, J. BADDILEY: Variation of polar lipid composition of Bacillus subtilis (Marburg) with different growth conditions. FEBS Let. 27, 16 (1972)

F. MÜLLER-LANDAU, D.A. CADENHEAD: Molecular packing in steroid-lecithin monolayers, Part II: Mixed films of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine and tetradecanoic acid. Chem. Phys. Lipids 25, 315 (1979)

J.F. NAGLE: Theory of lipid monolayer and bilayer phase transitions: Effect of headgroup interactions. J. Membrane Biol. 27, 233 (1976)

J.F. NAGLE: Theory of the main lipid bilayer phase transition. Ann. Rev. Phys. Chem. 31, 157 (1980)

T. NAKAMURA, M. NISHIKAWA, K. INOUE, S. NOJIMA, T. AKIYAMA, U. SANKAWA: Phosphatidylcholine liposomes containing cholesterol analogs with side-chains of various lengths. Chem. Phys. Lipids 26, 101 (1980)

E. NEHER, H. EIBL: The influence of phospholipid polar groups on gramicidin channels. Biochim. Biophys. Acta 464, 37 (1977)

W.D. NES, E. HEFTMANN: A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. J. of Natural Products 44, 377 (1981)

W.D. NES, G.W. PATTERSON: Effects of tetracyclic and pentacyclic triterpenoids an growth of Phytophthora cactorum. J. of Natural Products 44, 215 (1981)

J.M. ODRIOZOLA, E. WAITZKIN, T.L. SMITH, K. BLOCH: Sterol requirement of Mycoplasma capricolum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4107 (1978)

J.A.F. OP DEN KAMP, E.M. BEVERS, R.F.A. ZWAAL: In: Structural and Kinetic Approach to Plasma Membrane Functions, 114 (1977). Ed.: C. Nicolau, A. Paraf. Springer, Berlin

S.J. OPELLA, J.P. YESINOWSKI, J.S. WAUGH: Nuclear magnetic resonance description of molecular motion and phase separation of cholesterol in lecithin dispersions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3812 (1976)

M. OSHIMA, A. MIYAGAWA: Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria. Lipids 9, 476 (1974)

M. OSHIMA, Y. SAKAKI, T. OSHIMA: Cyclohexyl fatty acids in acido-thermophilic bacterial membranes and phage capsids. In: Biochemistry of Thermophily, 31 (1978). Ed.: S.M. Friedmann. Academic Press›New York

G. OURISSON, P. ALBRECHT, M. ROHMER: The hopanoids. Pure & Appl. Chem. 51, 709 (1979)

G. OURISSON, M. ROHMER: Prokaryotic polyterpenes: Phylogenetic precursors of sterols. In: Curr. Topics Membranes Transp. 17, 153 (1982). Ed.: F. Bronner, A. Kleinzeller, Academic Press, New York

P. OVERATH, M. BRENNER, T. GULIK-KRZYWICKI, E. SHECHTER, L. LETELLIER: Lipid phase transition in cytoplasmic and outer membranes of Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 389, 358 (1975)

P. OVERATH, H. TRÄUBLE: Phase transitions in cells, membranes, and lipids of Escherichia coli: Detection by fluorescent probes, light scattering, and dilatometry. Biochemistry 12, 2625 (1973)

J.C. OWICKI, H.M. MCCONNELL: Theory of protein - lipid and protein-protein interactions in bilayer membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4750 (1979)

D. PAPAHADJOPOULOS, S. NIR, S. OHKI: Permeability properties of phospholipid membranes: Effect of cholesterol and temperature. Biochim. Biophys. Acta 266, 561 (1972)

A.B. PARDEE: Membranes and the coordination of cellular activities. In: Biomembranes 2, 1 (1971). Ed.: L.A. Manson. Plenum Press, New York, London

T.E. PATT, R.S. HANSON: Intracytoplasmic membrane, phospholipid, and sterol content of Methylobacterium organophilum cells grown under different conditions. J. Bacteriol. 134, 636 (1978)

B.A. PETHICA: The thermodynamics of monolayer penetration at constant area. Part I. Trans. Faraday Soc. 51, 1402 (1955)

M.C. PHILLIPS: In: Progress in Surface and Membrane Science, Vol. 5, 139 (1972). Ed.: J.F. Danielli, M.D. Rosenberg, D.A. Cadenhead. Academic Press, New York

M.C. PHILLIPS, D. CHAPMAN: Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacylphosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta 163, 301 (1968)

M.C. PHILLIPS, H. HAUSER, E. PALTAUF: The inter- and intramolecular mixing of hydrocarbon chains in lecithin-water systems. Chem. Phys. Lipids 8, 127 (1972)

M.C. PHILLIPS, R.M. WILLIAMS, D. CHAPMAN: On nature of hydrocarbon chain motions in lipid liquid crystals. Chem. Phys. Lipids 3, 234 (1969)

M.M. POO, R.A. CONE: Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. Nature 247, 438 (1974)

K. PORALLA, W.A. KÖNIG: The occurrence of ω-cycloheptane fatty acids in a thermo-acidophilic Bacillus. FEMS Microbiol. Let. 16, 303 (1983)

K. PORALLA, E. KANNENBERG, A. BLUME: A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic Bacillus acidocaldarius, has a cholesterol-like function in membranes. FEBS Let. 113, 107 (1980)

H.D. PRICE, T.E. THOMPSON: Properties of liquid bilayer membranes separating two aqueous phases: Temperature dependence of water permeability. J. Mol. Biol. 41, 443 (1969)

M.J. PRINGLE, D. CHAPMAN: Biomembrane structure and effects of temperature. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes, 21 (1981). Ed.: G.J. Morris, A. Clarke. Academic Press, New York

P.L. PRIVALOV, V.V. PLOTNIKOV, V.V. FILIMONOV: Precision scanning microcalorimeter for the study of lipids. J. Chem. Thermodyn. 7, 41 (1975)

S. RAZIN: Physiology of Mycoplasma. In: Advances in Microbial Physiology, 10, 1 (1973). Ed.: A.A. Rox, D.W. Tempest. Academic Press, London

S. RAZIN: Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing Mycoplasmas. FEBS Let. 47, 81 (1974)

S. RAZIN: The Mycoplasma membrane. Prog. Surf. Membr. Sci. 9, 257 (1975)

S. RAZIN: The Mycoplasmas. Microbiol. Rev. 42, 414 (1978)

S. RAZIN: Sterols in Mycoplasma membranes. Curr. Topoics Membrans Transp. 17, 183 (1982)

S. RAZIN, S. KUTNER, H. EFRATI, S. ROTTEM: Phospholipid and cholesterol uptake by Mycoplasma cells and membranes. Biochim. Biophys. Acta 598, 628 (1980)

S. RAZIN, S. ROTTEM: Techniques for the manipulation of Mycoplasma membranes. In: Biochemical Analyses of Membranes, 3 (1976). Ed.: A.H. Maddy. Chapman and Hall. Ltd.,London

J.P. REEVES, R.M. DOWBEN: Water permeability of phosphilipid vesicles. J. Membrane Biol. 3, 123 (1970)

J. REIZER: Thermotropic properties and function of the membrane of a thermophilic Bacillus. Ph. D. Thesis, Hebrew University, Jerusalem, Iarael (1978)

R. RENDI: Water extrusion in isolated subcellular fractions. VI. Osmotic properties of swollen phospholipid suspensions. Biochim. Biophys. Acta 135, 333 (1967)

L. RILFORS, A. WIESLANDER, S. STAHL: Lipid and protein composition of membranes of Bacillus megaterium.Variants in the temperature range 5 to 70°C. J. Bacteriol. 135, 1043 (1978)

A.W. RODWLL: The steroid growth-requirement of Mycoplasma mycoides. J. Gen. Microbiol. 32, 91 (1963)

A.W. RODWELL, A. MITCHELL: Nutrition, growth, and reproduction. In: The Mycoplasmas 1, 111 (1979). Ed.: M.F. Barile, S. Razin. Academic Press,New York

M. ROHMER, P. BOUVIER, G. OURISSON: Molecular evolution of biomembranes: Structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 847 (1979)

A. RÖLL: Über das Vorkommen von Hopanoiden in veg. Zellen und Cysten von Azotobacter vinelandii und in neu isolierten, thermoacidophilen Bacillen-Arten. Diplomarbeit Univ. Tübingen (1981)

M. ROSSIGNOL, P. THOMAS, G. GRIGNON: Proton permeability of liposomes from natural phospholipids mixtures. Biochim. Biophys. Acta 684, 195 (1982)

S. ROTTEM: Membrane lipids of Mycoplasmas. Biochim. Biophys. 604, 65 (1980)

S. ROTTEM, E.A. PFENDT, L. HAYFLICK: Sterol requirement of T-strain Mycoplasma. J. Bacteriol. 105, 323 (1971)

S. ROTTEM, J. YASHOUV, Z. NEEMAN, S. RAZIN: Cholesterol im Mycoplasma membranes: Composition, ultrastructure and biological properties of membranes from Mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. Biochim. Biophys. Acta 323, 495 (1973)

G. ROUSER, G.J. NELSON, S. FLEISCHER, G. SIMON: In: Biological Membranes 1, 5 (1968). Ed.: D. Chapman. Academic, Press New York

G. ROUSER, G. KRITSCHENSY, G. YAMAMOTO, C. SIMON, GALLI, A.J. BAUMANN: Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids, and pigments. In: Methods in Enzymol. Vol. XIV, 272 (1969), Ed.: J.M. Lowenstein. Academic Press New York, London

J.E. ROTHMAN, D.M. ENGELMAN: Molecular mechanism for the interaction of phospholipid with cholesterol. Nature 237, 42 (1972)

J.L.R. RUBINSTEIN, B.A. SMITH, H.M. MCCONNELL: Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 15 (1979)

E. SACKMANN: Dynamic molecule-organization in vesicles and membranes. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 82, 891 (1978)

E. SACKMANN: Physikalische Grundlagen der molekularen Organisation und Dynamik von Membranen. In: Biophysik, 439 (1982^2). Ed.: W. Hoppe, W. Lohmann, H. Mark , H. Ziegler. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg

E. SACKMANN, H. TRÄUBLE, H.J. GALLA, P. OVERATH: Lateral diffusion, protein mobility, and phase transitions in Escherichia coli membranes. A spin label study. Biochemistry 12, 5360 (1973)

N.J. SALSBURY, A. DARKE, D. CHAPMAN: Deuteron magnetic resonance studies of water associated with phospholipds. Chem. Phys. Lipids 8, 142 (1972)

G.H. SCHENK, J.S. FRITZ: Acid-catalyzed acetylation of organic hydroxyl groups. Analytical Chemistry 31, 1808 (1959)

H.L. SCOTT, WOOD-HI CHENG: Lipid Monolayer Phase transitions. Theoretical considerations. J. Coll. Interf. Sci. 62, 125 (1977)

J. SEELIG, J.L. BROWNING: General features of phospholipid conformation in membranes. FEBS Let. 92, 41 (1978)

J. SEELIG, H. GALLY, R. WOHLGEMUTH: Orientation and flexibility of the choline head group in phosphatidylcholine bilayers. Biochim. Biophys. 467, 109 (1977)

A. SEELIG, J. SEELIG: The dynamic structure fo fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic resonance. Biochemistry 13, 4839 (1974)

G. SESSA, G. WEISSMANN: Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. J. Lipid Res. 9, 310 (1968)

D.O. SHAH: Monolayers of lipids in relation to membranes. Progr. Surf. Sci. 3, 221 (1972)

D.O. SHAH, J.H. SCHULMAN: Influence of calcium, cholesterol and unsaturation on lecithin monolayers. J. Lipid Res. 8, 215 (1967)

G.G. SHIPLEY: In: Biological Membranes 2, 1 (1973). Ed.: D. Chapman, D.F.H. Wallach. Academic Press London, New York

J.R. SILVIUS, N. MAK, R.N. MCELHANEY: Why do prokaryotes regulate membrane fluidity? In: Membrane Fluidity, 213 (1980a). Ed.: M. Kates, A. Kuksis. The Human Press Inc. Clifton, New Jersey

J.R. SILVIUS, N. MAK, R.N. MCELHANEY: Lipid and protein composition and thermotropic lipid phase transitions in fatty acid-homogeneous membranes of Acholeplasma laidlawii B. Biochim. Biophys. Acta 597, 199 (1980b)

J.R. SILVIUS, R.N. MCELHANEY: Effects of phospholipid acyl chain structure on physical properties. I: Isobranched phosphatidylcholines. Chem. Phys. Lipids 24, 287 (1979a)

J.R. SILVIUS, R.N. MCELHANEY: Effects of phosphalipid acyl chain structure on thermotropic phase properties. 3. Phosphatidylcholines with L- or DL-anteisoacylchains. Chem. Phys. Lipids 25, 125 (1979b)

J.R. SILVIUS, R.N. MCELHANEY: Membrane lipid physical state and modulation of the Na^+, Mg^{2+}-ATPase activity in Acholeplasma laidlawii B. Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 1255 (1980)

M. SINENSKY: Homeoviscous adaption - a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 522 (1974)

S.J. SINGER, G. NICOLSON: The luid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175, 720 (1972)

V.P. SKIPSKI, M. BARCLAY: Thin-layer chromatography of lipids. In: Methods of Encymology 14, 530 (1969). Ed.: J.M. Lowenstein. Academic Press London, New York

P.F. SMITH: Fate of ergosterol and cholestanol in Pleuropneumonia-like organisms. J. Bacter. 84, 534 (1962)

P.F. SMITH: Relation of sterol structure to utilization in Pleuropneumonia-like organisms. J. Lipid Research 5, 121 (1964)

P.F. SMITH: The lipids of Mycoplasma. Advan. Lipid Res. 6, 69 (1968)

P.F. SMITH, J.E. BOUGHTON: Role of protein and phospholipid in the growth of Pleuropneumonia-like organism. J. Bacteriol. 80, 851 (1960)

M.W. SMITH, N.G.A. MILLER: Phospholipids and membrane function chieving temperature adaption. In: Animals and Envrionmental Fitness 1, 521 (1980). Ed.: R. Gilles. Pergamon Press, Oxford

K.A. SOUZA, L.L. KOSTIW, B.J. TYSON: Alterations in normal fatty acid composition in a temperature-sensitiv mutant of a thermophilic bacillus. Arch. Microbiol. 97, 89 (1974)

J.M. STEIM: Spectroscopic and calorimetric studies of biological membrane structure. In: Molecular Association in Biological and related Systems 84, 259 (1968). Ed.: R.F. Gould. Am. Chem. Soc., Washington, D.C.

J.M. STEIM, M.E. TOURTELLOTTE, J.C. REINERT, R.N. MCELHANEY, R.L. RADER: Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 104 (1969)

W.D. STEIN: In: The Movement of Molecules Across Cell Membranes (1967). Academic Press, New York

K.O. STETTER: Ultrathin mycelia-forming organisms from submarine volcanic areas having an optimum growth temperature of 105°C. Nature 300, 258 (1982)

W. STOFFEL, B.D. TUNGGAL, O. ZIERENBERG, E. SCHREIBER, E. BINCZEK: ^{13}C Nuclear magnetic resonance studies of lipid interactions in single- and multi-component lipid vesicles. Hoppe Seyler's Physiol. Chem. 355, 1367 (1974)

J.M. STURTEVANT: Phase transition of phospholipids. In: Quantum Statistical Mechanics in the Natural Sciences, 63 (1974). Ed.: B. Kursonoglu, S. Mintz, S. Widmayer. Plenum Press, New York

K.E. SUCKLING, H.A.F. BLAIR, G.S. BOYD, I.F. CRAIG, B.R. MALCOLM: The importance of the phospholipid bilayer and the length of the cholesterol molecule in membrane structure. Biochim. Biophys. Acta 551, 10 (1979)

K.E. SUCKLING, G.S. BOYD: Interaction of the cholesterol side-chain with egg lecithin. A spin label study. Biochim. Biophys. Acta 436, 295 (1976)

J. SUNAMOTO, K. IWAMOTO, K. INOUE, T. ENDO, N. SHOSHICHI: Liposomal Membranes. XI. Suggestion to structural characteristics of acido-thermophilic bacterial membranes. Biochim. Biophys. Acta 685, 283 (1982)

K.J. SUZUKI, S. KAZUKI, A. KAWAGUCHI, O. SHIGENOBU, K. KOMAGATA: Occurence of ω-cyclohexyl fatty acids in Curtobacterium pusillum strains. J. Gen. Appl. Microbiol. 27, 261 (1981)

K. TAJIMA, N.L. GERSHFELD: Equilibrium studies of lecithin-cholesterol interactions. II. Phase relations in surface films: Analysis of the "condensing" effect of cholesterol. Biophysical J. 22, 489 (1978)

L. TANFORD: The hydrophobic effect and the organization of living matter. Science 200, 1012 (1978)

A. TARDIEU, V. LUZZATI, F.C. REMAN: Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: A study of lecithin-water phases. J. Mol. Biol. 75, 711 (1973)

J. TINOCO, D.J. MCINTOSH: Interactions between cholesterol and lecithins in monolayers at the air-water interface. Chem. Phys. Lipids 4, 72 (1970)

L.J. TIRRI, P.C. SCHMIDT, R.K. PULLARKAT, H. BROCKERHOFF: Studies on the hydrogen belts of membranes: II. Non-electrolyte permeability of liposomes of diester, diether, and dialkyl phosphatidylcholine and cholesterol. Lipids 12, 863 (1977)

H. TRÄUBLE: The movement of molecules across lipid membranes: A molecular theory. J. Membrane Biol. 4, 193 (1971)

H. TRÄUBLE, H. EIBL, H. SAWADA: Respiration - a critical phenomenon? Lipid phase transition in the lung alveolar surfactant. Naturw. 61, 344 (1974)

L.L.M. VAN DEENEN: In: Progress in the Chemistry of fats and other Lipids. 8, 37 (1965). Ed.: R.T. Hollmann. Pergamon Press, Oxford

L.L.M. VAN DEENEN: Chemistry of phospholipids in relation to biological membranes. Pure Appl. Chem. 25, 25 (1971)

F.A. VANDENHEUVEL: Structural studies of biological membranes: the structure of myelin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 122, 57 (1965)

E.J.J. VAN ZOELEN, E.C.M. VAN DER NEUT-KOK, J. DE GIER, L.L.M. VAN DEENEN: Osmotic behaviour of Acholeplasma laidlawii B cells with membrane lipids in liquid-crystalline and gel state. Biochim. Biophys. Acta 394, 463 (1975)

D.J. VAUGHAN, K.M. KEOUGH: Changes in phase transitions of phosphatidylethanolamine- and phosphatidylcholine-water dispersions induced by small modifications in the headgroup and backbone regions. FEBS Let. 47, 158 (1974)

A.J. VERKLEIJ, P.H.J. VERVERGAERT, B. DE KRUYFF, L.L.M. VAN DEENEN: The distribution of cholesterol in bilayers of phosphatidylcholines as visualized by freeze fracturing. Biochim. Biophys. Acta 373, 495 (1974)

P.H.J.Th. VERVERGAERT, B. DE KRUIJFF, A.J. VERKLEIJ, J.F. TOCANNE, L.L.M. VAN DENEN: Calorimetric and freeze-etch study of the influence of Mg^{2+} on the thermotropic behaviour of phosphatidylglycerol. Chem. Phys. Lipids 14, 97 (1975)

F. VILLALONGA: Surface chemistry of L-α-dipalmitoyl lecithin at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta 163, 290 (1968)

A.I. VOGEL: A Textbook of Quantitative Inorganic Analyses. Longmans, London, 810 (1961). Longmans, London

A. WEERKAMP, W. HEINEN: Effect of temperature on the fatty acid composition of the extreme thermophiles, Bacillus caldolyticus and Bacillus caldotenax. J. Bacteriol. 109, 443 (1972)

G. WEITZEL, A.M. FRETZDORFF, S. HELLER: Biochemie verzweigter Carbonsäuren. IX. Mitteilung: Monomolekulare Filme der einfach methylierten Palmitinsäuren. Hoppe Seyler's Physiol. Chem. 288, 189 (1951a)

G. WEITZEL, A.M. FRETZDORFF, S. HELLER: Biochemie verzweigter Carbonsäuren. X. Mitteilung: Monomolekulare Filme der einfach methylierten Stearinsäuren. Hoppe Seyler's Physiol. Chem. 288, 200 (1951b)

M.A. WELLS, J.C. DITTMER: The use of sephadex for the removal of nonlipid contaminants from lipid extracts. Biochemistry 2, 1259 (1963)

A. WIESLANDER, A. CHRISTIANSSON, L. RILFORS, G. LINDBLOM: Lipid bilayer stability in membranes. Regulation of lipid composition in Acholeplasma laidlawii as governed by molecular shape. Biochemistry 19, 3650 (1980)

A. WIESLANDER, A. CHRISTIANSSON, L. RILFORS, A. KAHN, L.B.A. JOHANSSON, G. LINDBLOM: Lipid phase structure governs the regulation of lipid composition in membranes of Acholeplasma laidlawii. FEBS Let. 124, 273 (1981)

G. WINKELMANN, W. ADAM: Herbicoline - Neue Acylpeptidantibiotika mit antimyzetischer Aktivität gegen Dermatophyten. Mykosen 23, 290 (1980)

C. WISDOM, N.E. WELKER: Membranes of Bacillus stearothermophilus: factors affecting protoplast stability and thermostability of alkaline phosphatase and reduced nicotinamid adenine dinucleotide oxidase. J. Bacteriol. 114, 1336 (1973)

E. WODTKE: Zum Problem der Adaptation von Biomembranen an die Temperatur. Habilitationsschrift, Christian-Albrecht-Universität, Kiel (1981)

P.L. YEAGLE, R.B. MARTIN, A.K. LALA, H.K. LIN, K. BLOCH: Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4924 (1977)

Lebenslauf

Ich wurde am 25. September 1948 in Fulda/Hessen geboren.

Die Grundschule besuchte ich von 1955 bis 1959 in Kämmerzell bei Fulda. Von 1959 bis 1965 war ich Schüler der Heinrich-von-Bibra Schule/Fulda, die ich mit dem Zeugnis der "Mittleren Reife" verließ. Im April 1965 wurde ich Chemielaborantenlehrling in der Ondal GmbH/Hünfeld. Mit dem Erwerb des Gehilfenbriefs schloß ich diese Ausbildungszeit im September 1968 ab. Ebenfalls 1968 beendete ich einen Abendkursus an der Berufs- und Berufsfachschule Fulda mit der Fachschulreife. In der Zeit von Herbst 1968 bis Sommer 1971 erwarb ich an der Winfriedschule Fulda die Hochschulreife. Zwischen Juli 1971 und September 1972 war ich als Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr. Ab dem Wintersemester 1972/73 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Chemie und ab dem Sommersemester 1973 Biologie und Physik. 1975 legte ich das Vordiplom in Biologie und die Zwischenprüfung in Physik ab. Im Oktober 1979 beendete ich das Studium der Biologie mit der Diplom-Hauptprüfung, Hauptfach Pflanzenphysiologie.

Unter Anleitung von Prof. Dr. K. Poralla verfertigte ich seit Februar 1980 die vorliegende Dissertation im Lehrbereich Mikrobiologie der Universität Tübingen.
Von Juli bis September 1981 arbeitete ich an der Herstellung eines Sorbents zur Detoxifikation von Blut durch Hämoperfusion am Israel Institut of Technology/Haifa.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Altendorf, D. Ammermann, E. Bayer, F.W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, W. Engelmann, U. Feine, F. Gönnewein, K.G. Grell, J. Guglielmi, W. Harder, V. Hemleben, F. Jähnig, G. Jung, E. Kallee, O. Klee, H. Krüger, E. Kulzer, E. Lindner, W. Loeffler, D. Mecke, H. Meier, H. Metzner, F.P. Möhres, E. Müller, H. Ninnemann, F. Oberwinkler, E. Pracht, H. Probst, A. Rieker, W. Rüdorf, H. Schenk, B. Schwemmle, H. Seiler, U. Seitz, W. Seyffert, D. Sperlich, G. Staudt, H. Stegmann, H. Straub, H. Stumpf, H. Suhr, K. Wegmann, G. Weizel, G. Winkelmann, H. Winkler, K. Wöhrmann, A. Wörz, H. Wolf, H. Zähner, V. Zarebnicky

D. GRÄBNER
Dissertations- u. Offsetdruckerei
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon 09545 / 8791